



Über dieses Buch

Dies ist ein digitales Exemplar eines Buches, das seit Generationen in den Regalen der Bibliotheken aufbewahrt wurde, bevor es von Google im Rahmen eines Projekts, mit dem die Bücher dieser Welt online verfügbar gemacht werden sollen, sorgfältig gescannt wurde.

Das Buch hat das Urheberrecht überdauert und kann nun öffentlich zugänglich gemacht werden. Ein öffentlich zugängliches Buch ist ein Buch, das niemals Urheberrechten unterlag oder bei dem die Schutzfrist des Urheberrechts abgelaufen ist. Ob ein Buch öffentlich zugänglich ist, kann von Land zu Land unterschiedlich sein. Öffentlich zugängliche Bücher sind unser Tor zur Vergangenheit und stellen ein geschichtliches, kulturelles und wissenschaftliches Vermögen dar, das häufig nur schwierig zu entdecken ist.

Gebrauchsspuren, Anmerkungen und andere Randbemerkungen, die im Originalband enthalten sind, finden sich auch in dieser Datei – eine Erinnerung an die lange Reise, die das Buch vom Verleger zu einer Bibliothek und weiter zu Ihnen hinter sich gebracht hat.

Nutzungsrichtlinien

Google ist stolz, mit Bibliotheken in partnerschaftlicher Zusammenarbeit öffentlich zugängliches Material zu digitalisieren und einer breiten Masse zugänglich zu machen. Öffentlich zugängliche Bücher gehören der Öffentlichkeit, und wir sind nur ihre Hüter. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit kostspielig. Um diese Ressource weiterhin zur Verfügung stellen zu können, haben wir Schritte unternommen, um den Missbrauch durch kommerzielle Parteien zu verhindern. Dazu gehören technische Einschränkungen für automatisierte Abfragen.

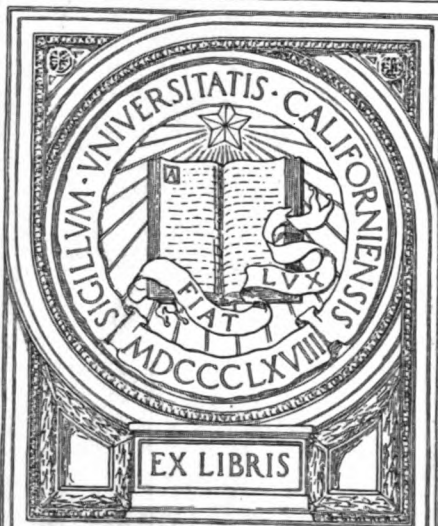
Wir bitten Sie um Einhaltung folgender Richtlinien:

- + *Nutzung der Dateien zu nichtkommerziellen Zwecken* Wir haben Google Buchsuche für Endanwender konzipiert und möchten, dass Sie diese Dateien nur für persönliche, nichtkommerzielle Zwecke verwenden.
- + *Keine automatisierten Abfragen* Senden Sie keine automatisierten Abfragen irgendwelcher Art an das Google-System. Wenn Sie Recherchen über maschinelle Übersetzung, optische Zeichenerkennung oder andere Bereiche durchführen, in denen der Zugang zu Text in großen Mengen nützlich ist, wenden Sie sich bitte an uns. Wir fördern die Nutzung des öffentlich zugänglichen Materials für diese Zwecke und können Ihnen unter Umständen helfen.
- + *Beibehaltung von Google-Markenelementen* Das "Wasserzeichen" von Google, das Sie in jeder Datei finden, ist wichtig zur Information über dieses Projekt und hilft den Anwendern weiteres Material über Google Buchsuche zu finden. Bitte entfernen Sie das Wasserzeichen nicht.
- + *Bewegen Sie sich innerhalb der Legalität* Unabhängig von Ihrem Verwendungszweck müssen Sie sich Ihrer Verantwortung bewusst sein, sicherzustellen, dass Ihre Nutzung legal ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass ein Buch, das nach unserem Dafürhalten für Nutzer in den USA öffentlich zugänglich ist, auch für Nutzer in anderen Ländern öffentlich zugänglich ist. Ob ein Buch noch dem Urheberrecht unterliegt, ist von Land zu Land verschieden. Wir können keine Beratung leisten, ob eine bestimmte Nutzung eines bestimmten Buches gesetzlich zulässig ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass das Erscheinen eines Buchs in Google Buchsuche bedeutet, dass es in jeder Form und überall auf der Welt verwendet werden kann. Eine Urheberrechtsverletzung kann schwerwiegende Folgen haben.

Über Google Buchsuche

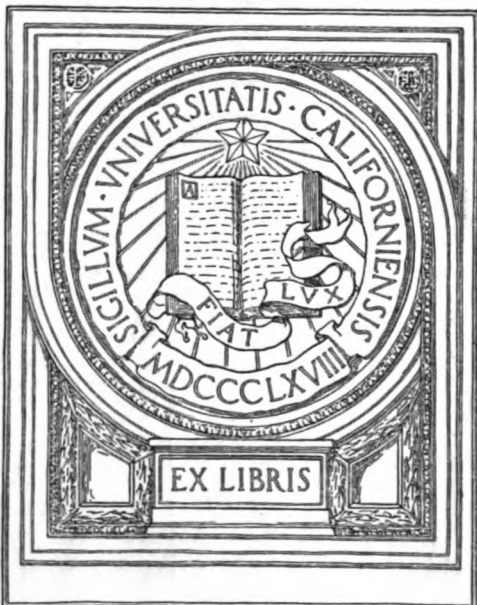
Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können Sie im Internet unter <http://books.google.com> durchsuchen.

MEDICAL SCHOOL
LIBRARY



EX LIBRIS

MEDICAL SCHOOL
LIBRARY



N. Israel-
 Park, A. B.
 P. Dettmar
 Berlin, B. L.
 New York
 Berlin, E.
 T. Haber-
 ind - abo
 Berlin, W.
 A. J. Kla
 Alvin, L.
 Lesser-Me
 München
 K. Mang
 Tübingen
 Düsseldorf
 W. Ost
 W. Paul
 Breslau
 H. Ripp
 T. Seel
 K. Sch
 Basel
 zow, V.
 C. Tig
 d. War
 W. Wie

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-Weihenstephan, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, E. Doerr-Basel, A. Darig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedberger-Berlin, E. Friedmann-Berlin, E. Fromm-Wien, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Åbo, V. Henri-Zürich, V. Henriques-Kopenhagen, E. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heuhaer-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, A. J. Kluyver-Delft, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, E. J. Lesser-Mannheim, P. A. Levene-New York, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, O. Meyerhof-Berlin, L. Michaelis-Baltimore, H. Molisch-Wien, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Omelianski-Leningrad, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Placcasson-Berlin, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, H. Rippel-Göttingen, P. Rosa-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-Leningrad, T. Sasaki-Tokio, E. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, A. Schlossmann-Düsseldorf, E. Schmitt-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, K. Suto-Kanasawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeler-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, C. Tigerstedt-Helsingfors, P. Trendelenburg-Freiburg i. Br., F. Verzár-Debreczen, O. Warburg-Berlin, H. J. Waterman-Delft, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertachtundachtzigster Band



Berlin

Verlag von Julius Springer

1927

THEO TO VIBU
JOHN DE JACKEN

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig

Inhalt.

	Seite
Geldrich, J. Über den Energieverbrauch beim Reiten.	1
Parnas, J. K., Wł. Mozołowski und W. Lewinski. Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. IX. Mitteilung: Der Zusammenhang des Blutammoniaks mit der Muskelarbeit.	15
Stasiak, Arenka. Über die Unwirksamkeit des direkt in den Darm eingeführten Insulins und Versuche zu deren Erklärung	24
Drastich, L. Eine Modifikation des Barcroft'schen Blutgasanalysenapparates und zugleich eines Mikrorespirometers	35
Zondek, S. G. und F. Matakas. Besteht ein ursächlicher Zusammenhang zwischen tonischer Muskelkontraktion und Milchsäurebildung?	40
Müller, Helmut. Zur Elementaranalyse stickstoffhaltiger Körper	56
Waterman, N. und L. de Kromme. Untersuchungen über Cytolyse beim Krebs. II.	65
Jendrassik, L. und L. Antal. Kationen und parasymphatische Gifte. Ein Beitrag zur Frage der Zondek'schen Theorie	75
Fränkel, Sigmund und Hermann Prinz. Über das Tryptoporphyrin	90
Freundlich, H. und G. V. Slottman. Über das Gelten der Traubesehen Regel bei der Hydrotropie	101
Feldt, Adolf und Rafael Vara-Lopez. Über Beeinflussung der Wasserstoffionenkonzentration des Blutes durch chemotherapeutische Stoffe	112
Wolf, A. C. Physikalisch-chemische Studien über den Einfluß oberflächenaktiver Stoffe auf Samenzellen (Weizen) und Sporen von <i>Tilletia tritici</i>	117
Utkin-Ljubowzow, L. Über das Antitrypsin des normalen Serums	134
Brugsch, Theodor und Hans Horsters. Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XXI. Mitteilung: Über Glykose-, Milchsäure- und Phosphorsäurebildung in der Leberaufschwemmung unter dem Einflusse von Insulin	147
— Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XXII. Mitteilung: Versuche über Bildung von Milchsäure in der Leber aus Äpfelsäure, Fumarsäure, Maleinsäure. Von Tsukio Ibuki	164
— Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XXIII. Mitteilung: Milchsäurebildung in der Leber nach Durchströmungsversuchen mit d-Fructose. Von Y. Harada	172
— Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XXIV. Mitteilung: Über die mangelnde Beeinflußbarkeit der Mutarotation der Glucose und d-Fructose durch Insulin. Von Paul Radt.	178
Neuberg, Carl und Maria Kobel. Quantitative Untersuchungen über den Abbau von Aminosäuren und Aminopurinen durch Methylglyoxal und verwandte Substanzen	197
— Weiteres über Abfangverfahren	211
Neuberg, Carl und Berta Ottenstein. Übertritt von Methylalkohol in den Tabakrauch	217
Neuberg, Carl, Joachim Wagner und Kurt P. Jacobsohn. Über die asymmetrische Wirkungsweise der Phosphatase und eine Methode zur biochemischen Darstellung der beiden entgegengesetzt drehenden Alkohole aus ihren Racematen	227

	Seite
Krogh, August und Fusakichi Nakazawa. Beiträge zur Messung des kolloid-osmotischen Druckes in biologischen Flüssigkeiten . . .	241
Hafner, E. A. Zur Energetik der Aussalzung	259
Wwedensky, Nikolaus. Oberflächenenergie einiger physiologischer Flüssigkeiten. I.	270
Smorodinzew, J. A. und A. N. Adowa. Zur Methodik der Chininbestimmung nach dem Verfahren von Hartmann und Zila . .	279
Gagarina, E. Zur Methodik der Katalasebestimmung im Blute und in den Tiergeweben	284
Gmeiner, Gerh. CO ₂ - und O ₂ -Analysen mit dem Haldaneapparat mittels automatischer Schwenkung	285
Glimm, E. und W. Sommer. Beitrag zur Reinigung der Malzamyrase	290
Fellenberg, Th. v. Über das Verhalten saurer und alkalischer Böden im Joddüngungsversuch	326
Fellenberg, Th. v. und Dr. (dsg.) Hans Pacher. Der Jodgehalt der Schilddrüsen verschiedener Rinderrassen und seine Beziehungen zur Beschaffenheit dieser Drüsen	339
Fellenberg, Th. v. Bestimmung organischer Stoffe durch Chromsäureoxydation	365
Tscharny, A. M. Die Rolle der Lunge im intermediären Stickstoffwechsel. I. Mitteilung: Der Gehalt an Gesamt- und Reststickstoff im rechten Herzen und im arteriellen Blute in der Norm und nach intravenöser Seruminjektion	372
Tscharny, A. und S. Krassowitzkaja. Die Rolle der Lunge im intermediären Stickstoffwechsel. II. Mitteilung: Reststickstoffgehalt des von der isolierten Lunge ab- und zufließenden defibrinierten Blutes	378
Waltner, K. Über die Wirkung großer Mengen Eisens. I. Mitteilung: Über die Wirkung des Eisens auf die Knochenentwicklung . .	381
Nishikawa, K. Zur Kenntnis der Takadiastase	386
Réssel, A. Einige orientierende Versuche über die physiologische Wirkung von zwei Disulfonen	405
Schultzer, Poul. Studien über Phosphor- und Calciumstoffwechsel bei mangelhaften Kostformen. I. Mitteilung: Die Einwirkung ultraviolettten Lichtes	409
— Studien über Phosphor- und Calciumstoffwechsel bei mangelhaften Kostformen. II. Mitteilung: Die Einwirkung von Lebertran . .	427
— Studien über Phosphor- und Calciumstoffwechsel bei mangelhaften Kostformen. III. Mitteilung: Veränderung des Phosphor- oder Calciumgehalts der Kost	435
Wwedensky, Nikolaus und P. J. Dobrowitzky. Methode zur Bestimmung der lipolytischen Wirkung von Pankreassaft und Blut.	448
Suski, P. M. Über den Einfluß der Verfütterung verschiedener aktiver Eisenverbindungen auf den Verlauf der Avitaminose bei Reistauben	459
Sjollema, B. Zur Blutzuckerfrage. III. Mitteilung: Weiteres über die Nichtglucose der Blutfiltrate	465
Goldberg, J. M. Über Netzfermente	475
Autorenverzeichnis	481

Über den Energieverbrauch beim Reiten.

Von
J. Geldrich.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 2. Juni 1927.)

Das Reiten kann sowohl als Sport wie auch als berufliche Arbeit (z. B. bei Polizisten, Soldaten) betrieben werden. Bei letzterer kann es unter Umständen sogar zu sehr großen Anforderungen darin kommen. Es schien daher nicht ohne Interesse zu sein, den Energieumsatz beim Reiten zu bestimmen, um so mehr, da wir darüber noch überhaupt keine Kenntnisse besitzen.

Dank der Liebenswürdigkeit des Herrn Oberstadthauptmanns von Budapest waren wir in der Lage, unsere Versuche mit Mannschaft und Tieren der ungarischen berittenen Staatspolizei auszuführen. Das war ein großer Vorteil für uns, denn außer der Frage eines geschulten, trainierten Reiters kam hauptsächlich der Umstand in Betracht, daß zur Ausführung einiger unten beschriebenen Versuche die ruhigen Polizeipferde, welche täglich 2 Stunden lang in den Verkehrsstraßen der Großstadt auf dem Posten, auch im größten Tumult sozusagen bewegungslos dastehen, als einzig geeignet zu betrachten waren. Wir sprechen darum den Herren Leitern der Staatspolizei für das gütige Fördern dieser Untersuchungen unseren besten Dank auch hiermit aus.

Methodik.

Der Energieumsatz wurde durch Bestimmung des respiratorischen Gaswechsels ermittelt. Wir bedienten uns dabei der *Douglasschen* Sackmethode (1). Der Sack von 100 Liter Inhalt war als Rucksack am Rücken angebracht, das Mundstück mittels einer Kappe am Kopf befestigt. Beide wurden während der Untersuchungen ohne jedwede Störung weder für die Versuchsperson, noch für den Versuch gut ertragen. Beim Galopp, welcher mit großer Erschütterung einhergeht, wurde das Mundstück mit der linken Hand gestützt. Die Luftprobe wurde in einem genau kalibrierten transportablen *Haldaneapparat* sofort analysiert. Über Einzelheiten der Technik und Berechnungen haben wir in früheren Arbeiten berichtet (2). Es sei nur bemerkt, daß Volumen der inspirierten Luft mittels der N_2 -Korrektion, Kalorien mittels der *Zuntz*schen Tabelle berechnet wurden. Die Arbeitswerte sind der Vergleichbarkeit wegen mit anderen Arbeiten, mit 20% Nutzeffekt auch in mkg umgerechnet, angegeben.

Die Versuche fanden im hiesigen Tattersall statt, während des Vormittags von 8 bis 12 Uhr, bei einem zumeist sehr günstigen Wetter des diesjährigen schönen, milden Herbstes. Nach Pferdepflege (von 6 bis 7 Uhr morgens) kam die Versuchsperson nüchtern, das ist 14 Stunden nach letzter Mahlzeit, in den von der Polizeikaserne unweit (etwa 5 Minuten) liegenden Tattersall zu Pferd. Nach Ankunft hatte sie etwa 15 Minuten ruhig gegessen und nachher auf einer Chaiselongue ohne irgend eine Muskelbewegung oder -spannung, schlaff und ruhig mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde lang gelegen. Nun wurde Nasenklemme und Mundstück (diesmal ohne Kappe) angelegt und das Mundstück mit dem auf einem Tische befindlichen Sack in Verbindung gesetzt. Tisch und Sack waren so aufgestellt, daß die Versuchsperson das Füllen des Sackes nicht beobachten konnte. Darauf erfolgte die Bestimmung des Ruheumsatzes. Nach Beendigung derselben wurde das Pferd bestiegen und es folgte in einzelnen Zeitabschnitten die Bestimmung des Umsatzes beim Sitzen im Sattel, bei Schritt, Trab und Galopp. In der Zwischenzeit war die Versuchsperson ausgerüstet ruhig im Sattel geblieben. Bei Bestimmung des Umsatzes während des Sitzens im Sattel hat die Versuchsperson zunächst $\frac{1}{2}$ Stunde lang nach Aufsitzen ruhig im Sattel gesessen und auch das Pferd ruhig gestanden, ebenso wie während des Versuchs.

Die Bestimmungen sind in Doppelversuchen ausgeführt worden. Jedem Experiment ist eine Vorperiode von 6 bis 2 Minuten vorausgegangen, während welcher in völliger Ausrüstung dieselbe Tätigkeit ausgeführt wurde, wie im Versuch selbst. Bei Bestimmung des Ruheumsatzes ist auch während der Vorperiode in den Sack geatmet worden, dieser gut durchgemischt und dann ohne Bestimmung entleert worden. Beim Reiten, wo die Differenzen naturgemäß viel größer sein mußten, hätte diese minutiöse Arbeit keinen Sinn gehabt, da das Warten während Ab- und Aufmontieren des Sackes einen viel größeren Fehler verursacht hätte. Hier wurde während der Vorperiode dieselbe Tätigkeit ausgeführt wie im Versuch, und der Dreiweghahn unmittelbar daran anschließend umgedreht. Die Versuchsperson wurde durch einen berittenen Begleiter während des Versuchs begleitet, welcher zur Aufgabe hatte, den Dreiweghahn zu gewünschter Zeit umzudrehen. Dies gelang auch immer ohne Anstand.

Die Versuchsdauer war immer so groß, bis der Sack voll angefüllt war. Die Zeitangaben sind in Dezimalbrüchen umgerechnet angeführt. Der Hahn wurde womöglich immer am Ende der Expiration gedreht.

Die Versuchspersonen waren vollkommen gesunde, in jeder Hinsicht normale Männer mittleren Alters, von sehr ruhigem Temperament. Alle erhielten ihre erste Ausbildung im Reiten noch während des Militärdienstes bei den Husaren. Ihre Daten sind in der Tabelle I zusammengestellt.

Als Tiere dienten zwei Pferde der berittenen Polizei: Aladár, ein äußerst ruhiges, Adonis, ein sehr feuriges. Aladár eignete sich vortrefflich zur Bestimmung des Umsatzes beim Sitzen im Sattel, sowie beim Reiten im Schritt, da er sich im Stehen auch 1 Stunde lang absolut ruhig verhalten hat. Sein Gang im Schritt war ruhig, ist nie in Galopp eingesprungen, sein Trab und Galopp gleichmäßig. Im Schritt und Galopp machte er die vorschrittmäßigen Schritte, d. h. 130 bzw. 500 pro Minute, im Trab etwas weniger als 300. Das Verstärken des Tempos auf 300 Schritt pro Minute ist bei ihm nicht gelungen, obwohl sonst ein ausgezeichnete Traber, weil dies sofort das Einspringen in Galopp zur Folge hatte. Adonis machte in jeder Gangart die vorschrittmäßige Schrittzahl, ist ein guter Traber,

doch sehr unruhig, sowohl beim Stehen wie auch im Lauf. Adonis diente zum Vergleich mit einem ruhigen Roß. Der Sattel war der bei der berittenen Polizei sowie auch der ganzen Kavallerie der ungarischen Armee für die Mannschaft bestimmte sogenannte ungarische oder Bocksattel. Auf die Decke gelegt, ist er durch Ober- und Untergurt befestigt. Es sei bemerkt, daß der Obergurt (ein 10 cm breiter Riemen) über das Sitzleder hinwegzieht.

Das Terrain war von verschiedener Beschaffenheit. 1. In der *gedeckten Reitschule* des Tattersalls wurde auf einem in den Reitschulen üblichen, weichen, sandigen, aber nicht tiefen Boden geritten. Die Reitbahn hatte eine leicht ovale Form und eine Länge von 100 m. 2. Die *offene Reitschule* von derselben Bodenbeschaffenheit wie die gedeckte, war auch oval, dessen schmaler Durchmesser 100 m betrug, die längeren Seiten je 160 m, die kürzeren je 90 m, insgesamt daher 500 m. 3. Die breite Straße des Pferdemarktes im Tattersall: ein Boden von einem nicht erhaltenen *Fahrweg*. Auf diesem Terrain wurde in einigen Versuchen 560, in anderen 680 m geritten. Die Reitbahn hatte eine ovale Form. Die langen, geraden Seiten des Ovals waren je 240 m, die kürzeren je 100 m lang.

Tabelle I.
Versuchspersonen.

Name	Bezeichnung im Versuch	Alter Jahre	Höhe cm	Körpergewicht ohne Bekleidg. kg	Pulsfrequenz	Blutdruck mm Hg	Dienstzeit bei Kavallerie Jahre	Qualität als Reiter
D. F.	A	37	166	67,8	72	120—90	8	geübter, guter Reiter
L. K.	B	25	166	65,1	66	118—78	3	weniger geübt
K. I. II.	C	32	163	85,4	64	124—86	9	geübter, guter Reiter

Tabelle II.
Versuchstiere.

Name, Bezeichnung	Alter Jahre	Höhe cm	Temperament	Geschlecht	Herkunft
Aladár	7	159	sehr ruhig	Wallach	gewöhnliche ungarische Husarenpferde
Adonis	7	160	sehr feurig	"	

Tabelle III.
Übersicht der Versuche.

Datum 1926	Versuch Nr.	Versuchsperson	Versuchstier	Terrain	Ruheumsatz pro Std. u. kg Körpergew. kg-cal	Bemerkung
27. IX.	1	A	Aladár	gedeckte Reitschule	1,19	Nicht nüchtern
28. IX.	2	A	"	" "	1,22	
29. IX.	3	B	"	" "	1,36	
3. X.	4	A	Adonis	" Fahrweg "	1,05	
1. X.	5	A	Aladár	" "	1,36	
5. X.	6	C	"	" "	1,03	
6. X.	7	C	"	Fahrweg und freie Reitschule	1,04	

Die Versuche fanden im hiesigen Tattersall statt, während des Vormittags von 8 bis 12 Uhr, bei einem zumeist sehr günstigen Wetter des diesjährigen schönen, milden Herbstes. Nach Pferdepflege (von 6 bis 7 Uhr morgens) kam die Versuchsperson nüchtern, das ist 14 Stunden nach letzter Mahlzeit, in den von der Polizeikaserne unweit (etwa 5 Minuten) liegenden Tattersall zu Pferd. Nach Ankunft hatte sie etwa 15 Minuten ruhig gegessen und nachher auf einer Chaiselongue ohne irgend eine Muskelbewegung oder -spannung, schlaff und ruhig mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde lang gelegen. Nun wurde Nasenklemme und Mundstück (diesmal ohne Kappe) angelegt und das Mundstück mit dem auf einem Tische befindlichen Sack in Verbindung gesetzt. Tisch und Sack waren so aufgestellt, daß die Versuchsperson das Füllen des Sackes nicht beobachten konnte. Darauf erfolgte die Bestimmung des Ruheumsatzes. Nach Beendigung derselben wurde das Pferd bestiegen und es folgte in einzelnen Zeitabschnitten die Bestimmung des Umsatzes beim Sitzen im Sattel, bei Schritt, Trab und Galopp. In der Zwischenzeit war die Versuchsperson ausgerüstet ruhig im Sattel geblieben. Bei Bestimmung des Umsatzes während des Sitzens im Sattel hat die Versuchsperson zunächst $\frac{1}{2}$ Stunde lang nach Aufsitzen ruhig im Sattel gegessen und auch das Pferd ruhig gestanden, ebenso wie während des Versuchs.

Die Bestimmungen sind in Doppelversuchen ausgeführt worden. Jedem Experiment ist eine Vorperiode von 6 bis 2 Minuten vorausgegangen, während welcher in völliger Ausrüstung dieselbe Tätigkeit ausgeführt wurde, wie im Versuch selbst. Bei Bestimmung des Ruheumsatzes ist auch während der Vorperiode in den Sack geatmet worden, dieser gut durchgemischt und dann ohne Bestimmung entleert worden. Beim Reiten, wo die Differenzen naturgemäß viel größer sein mußten, hätte diese minutiöse Arbeit keinen Sinn gehabt, da das Warten während Ab- und Aufmontieren des Sackes einen viel größeren Fehler verursacht hätte. Hier wurde während der Vorperiode dieselbe Tätigkeit ausgeführt wie im Versuch, und der Dreiweghahn unmittelbar daran anschließend umgedreht. Die Versuchsperson wurde durch einen berittenen Begleiter während des Versuchs begleitet, welcher zur Aufgabe hatte, den Dreiweghahn zu gewünschter Zeit umzudrehen. Dies gelang auch immer ohne Anstand.

Die Versuchsdauer war immer so groß, bis der Sack voll angefüllt war. Die Zeitangaben sind in Dezimalbrüchen umgerechnet angeführt. Der Hahn wurde womöglich immer am Ende der Expiration gedreht.

Die Versuchspersonen waren vollkommen gesunde, in jeder Hinsicht normale Männer mittleren Alters, von sehr ruhigem Temperament. Alle erhielten ihre erste Ausbildung im Reiten noch während des Militärdienstes bei den Husaren. Ihre Daten sind in der Tabelle I zusammengestellt.

Als Tiere dienten zwei Pferde der berittenen Polizei: Aladár, ein äußerst ruhiges, Adonis, ein sehr feuriges. Aladár eignete sich vortrefflich zur Bestimmung des Umsatzes beim Sitzen im Sattel, sowie beim Reiten im Schritt, da er sich im Stehen auch 1 Stunde lang absolut ruhig verhalten hat. Sein Gang im Schritt war ruhig, ist nie in Galopp eingesprungen, sein Trab und Galopp gleichmäßig. Im Schritt und Galopp machte er die vorschrittsmäßigen Schritte, d. h. 130 bzw. 500 pro Minute, im Trab etwas weniger als 300. Das Verstärken des Tempos auf 300 Schritt pro Minute ist bei ihm nicht gelungen, obwohl sonst ein ausgezeichnete Traber, weil dies sofort das Einspringen in Galopp zur Folge hatte. Adonis machte in jeder Gangart die vorschrittsmäßige Schrittzahl, ist ein guter Traber,

doch sehr unruhig, sowohl beim Stehen wie auch im Lauf. Adonis diente zum Vergleich mit einem ruhigen Roß. Der Sattel war der bei der berittenen Polizei sowie auch der ganzen Kavallerie der ungarischen Armee für die Mannschaft bestimmte sogenannte ungarische oder Bocksattel. Auf die Decke gelegt, ist er durch Ober- und Untergurt befestigt. Es sei bemerkt, daß der Obergurt (ein 10 cm breiter Riemen) über das Sitzleder hinwegzieht.

Das Terrain war von verschiedener Beschaffenheit. 1. In der *gedeckten Reitschule* des Tattersalls wurde auf einem in den Reitschulen üblichen, weichen, sandigen, aber nicht tiefen Boden geritten. Die Reitbahn hatte eine leicht ovale Form und eine Länge von 100 m. 2. Die *offene Reitschule* von derselben Bodenbeschaffenheit wie die gedeckte, war auch oval, dessen schmaler Durchmesser 100 m betrug, die längeren Seiten je 160 m, die kürzeren je 90 m, insgesamt daher 500 m. 3. Die breite Straße des Pferdemarktes im Tattersall: ein Boden von einem nicht erhaltenen *Fahrweg*. Auf diesem Terrain wurde in einigen Versuchen 560, in anderen 680 m geritten. Die Reitbahn hatte eine ovale Form. Die langen, geraden Seiten des Ovals waren je 240 m, die kürzeren je 100 m lang.

Tabelle I.

Versuchspersonen.

Name	Bezeichnung im Versuch	Alter Jahre	Höhe cm	Körpergewicht ohne Bekleidg. kg	Pulsfrequenz	Blutdruck mm Hg	Dienstzeit bei Kavallerie Jahre	Qualität als Reiter
D. F.	A	37	166	67,8	72	120—90	8	geübter, guter Reiter
L. K.	B	25	166	65,1	66	118—78	3	weniger geübt
K. I. II.	C	32	163	85,4	64	124—86	9	geübter, guter Reiter

Tabelle II.

Versuchstiere.

Name, Bezeichnung	Alter Jahre	Höhe cm	Temperament	Geschlecht	Herkunft
Aladár	7	159	sehr ruhig	Wallach	gewöhnliche ungarische Husarenpferde
Adonis	7	160	sehr feurig	"	

Tabelle III.

Übersicht der Versuche.

Datum 1926	Versuch Nr.	Versuchsperson	Versuchstier	Terrain	Ruheumsatz pro Std. u. kg Körpergew. kg-cal	Bemerkung
27. IX.	1	A	Aladár	gedeckte Reitschule	1,19	Nicht nüchtern
28. IX.	2	A	"	" "	1,22	
29. IX.	3	B	"	" "	1,36	
3. X.	4	A	Adonis	" Fahrweg "	1,05	
1. X.	5	A	Aladár	" "	1,36	
5. X.	6	C	"	" "	1,03	
6. X.	7	C	"	Fahrweg und freie Reitschule	1,04	

Tabelle IV.
Versuch I.

Bezeichnung der Bestimmung	Sack Nr.	Versuchs- dauer Min.	Weg pro Min. m	Pferde- schritte pro Min.	Redu- ziertes Volumen Liter	Redu- ziertes Minuten- volumen Liter	Produ- zierte CO ₂ o/o	Ver- brauchter O ₂ o/o	Produ- zierte CO ₂ pro Min. ccm	Ver- brauchter O ₂ pro Min. ccm	R. Q.	Umsatz pro Minute in	
												kg-cal	o/o
Ruheumsatz . .	I	9	—	—	66,55	7,39	2,91	3,85	214	284	0,75	1,346	100
" . .	II	9	—	—	67,01	7,44	2,88	3,86	214	287	0,75	1,360	101
Sitzen im Sattel	III	6	—	—	51,08	8,51	2,80	3,87	238	329	0,72	1,546	115
" " "	IV	7,5	—	—	63,62	8,46	2,64	3,52	224	298	0,75	1,417	105
Schritt	V	6,0	92	120	65,36	10,89	3,13	4,08	341	444	0,77	2,113	157
"	VI	6,1	90	118	68,47	11,22	2,93	3,88	329	435	0,75	2,063	153
Trab	VII	2,66	173	170	48,70	18,31	3,70	4,59	677	840	0,81	4,040	223
"	VIII	3,0	194	180	65,18	21,73	3,94	4,84	856	1052	0,81	5,060	376
Galopp (kurzer)	IX	2,1	345	330	81,17	38,70	4,28	4,76	1656	1842	0,90	9,063	673
" "	X	2,0	328	320	78,70	39,35	4,19	4,61	1649	1814	0,91	8,961	666

Als Beispiel der Ausführung der Versuche und deren zeitlichen Verlauf führen wir Versuch 1 in Tabelle IV an. Im weiteren sind die Zeitangaben weggelassen, da sie mit denen in Tabelle IV völlig übereinstimmen, und von den Doppelversuchen des Ruheumsatzes ist auch nur einer angegeben.

Zeitlicher Verlauf.

7h45'	Ankommen in der Reitschule.	
7h45' bis 7h60'	Versuchsperson sitzt auf einer Bank.	
8h 5' „ 8h35'	Liegt in ruhiger Rückenlage auf einer Chaiselongue.	
8h35' „ 8h37'	Vorbereitung (Anlegen der Nasenklemme, des Mundstückes usw.).	
8h37' „ 8h42'	Vorperiode I	} Liegend, Atemfrequenz 20, Puls 64.
8h42' „ 8h47'	Vorperiode II	
8h47' „ 8h56'	Atmen in den Sack I	
8h57' „ 8h66'	Atmen in den Sack II	
9h15' „ 9h17'	Aufsitzen und Ausrüsten.	
9h17' „ 9h47'	Sitzt ruhig und ausgerüstet im Sattel zu Pferd.	
9h47' „ 9h51'	Vorperiode III	} Sitzt ruhig im Sattel. Das Roß steht vollkommen ruhig und bewegungslos. Atemfrequenz 22 pro Minute.
9h51' „ 9h55'	Vorperiode IV	
9h56' „ 9h62'	Atmen in den Sack III	
10h 3' „ 10h10' 30"	Atmen in den Sack IV	
10h27' „ 10h30'	Vorperiode V	} Reiten im Schritt. Gleichmäßiger, ruhiger Gang.
10h31' „ 10h37'	Atmen in den Sack V	
10h38' „ 10h41'	Vorperiode VI	
10h41' „ 10h47' 6"	Atmen in den Sack VI	
		} Traben. In VII ein ungestörter gleichmäßiger Trab. In VIII ist das Pferd erschrocken, gestiegen, hat aufgeschlagen und ist in Galopp eingesprungen, konnte nur mit Mühe im Traben erhalten werden.
11h17' „ 11h20'	Vorperiode VII	
11h20' „ 11h22' 40"	Atmen in den Sack VII	
11h24' „ 11h26'	Vorperiode VIII	
11h27' „ 11h29'	Atmen in den Sack VIII	} Reiten im Galopp (kurzer). Gleichmäßiger, ruhiger Gang.
11h51' „ 11h53'	Vorperiode IX	
11h54' „ 11h56' 6"	Atmen in den Sack IX	
11h59' „ 12h 1'	Vorperiode X	
12h 1' „ 12h 3'	Atmen in den Sack X	

Zwischen den einzelnen Versuchsperioden hat die Versuchsperson ruhig zu Pferd gesessen.

Ergebnisse.

Die Ruheumsatzwerte weisen in den Doppelversuchen eine Differenz von etwa 1 % untereinander auf. Da die zweite Bestimmung gewöhnlich erst 1 Stunde nach Beginn des ruhigen Liegens stattgefunden hat (s. die Zeitangabe), so sind wir berechtigt, die erhaltenen Daten als die wahren Ruheumsatzwerte der Versuchsperson am betreffenden Tage zu erachten. Wie aus Tabelle III hervorgeht, fanden wir für C 1,03 bzw. 1,04 kg-cal/Stunde und Kilogramm Körpergewicht, also den theoretischen Wert des Grundumsatzes. Auch für A ergab sich der normale Wert von 1,05 Cal/Stunde in Versuch 4, in den übrigen Versuchen jedoch etwas höhere Werte. Obzwar zur Bestimmung und Berechnung des reinen Arbeitswertes aus obigem Grunde auch diese Daten durchaus maßgebend sein könnten, so zeigt doch Versuch 4 den Minimalverbrauch dieser Versuchsperson an. Um daher sämtliche Versuche auf eine einheitliche Grundlage zu stellen, haben wir es vorgezogen, für jene Versuche, in welchen der Ruheumsatz über 1,05 Cal pro Stunde und Kilogramm Körpergewicht war, eine Korrektur vorzunehmen und sämtliche Werte auch mit dieser Korrektur, wobei der Ruheumsatzwert mit 1,05 Cal/Stunde und Kilogramm Körpergewicht angenommen war, zu berechnen.

Bei Bestimmung des Energieumsatzes beim Reiten ist zunächst festzustellen, inwieweit der Umsatz durch das bloße ruhige Sitzen im Sattel gesteigert wird. Dies läßt sich aus Versuch 1 und 2 berechnen. In diesen Experimenten hatte das Roß so ruhig gestanden, daß die Versuchsperson nur die zur Aufrechterhaltung des Körpers bei bequemem, ruhigem, nicht strammem Sitzen im Sattel nötige Muskeltätigkeit ausgeführt hatte. Als Mittelwert ergibt sich dafür 7 % Mehrverbrauch über das ruhige Liegen. In den übrigen Versuchen hatte das Pferd nicht so absolut ruhig gestanden, sondern es hat auch einige Male den Kopf in die Höhe geschneilt, manchmal den Kopf geschüttelt usw., so daß die Versuchsperson zur Beruhigung durch Anziehen des Zügels genötigt war extra Muskelbewegungen auszuführen. Diese Werte lassen sich daher mehr zur Berechnung des Umsatzes während des gewöhnlichen *ruhigen Sitzens zu Pferde*, wobei das Roß auf einem Orte ruhig steht, heranziehen. Dafür findet man einen Mehrverbrauch von 31 % über ruhiges Liegen. Als Mittel von sämtlichen Daten ergibt sich der korrigierte Wert von 37 % Mehrverbrauch gegen den Grundumsatz.

Beim Reiten findet man je nach der Gangart verschiedene, voneinander stark abweichende Werte im Energieumsatz. Dabei zeigt es sich, daß im allgemeinen der Umsatz beim Reiten im Schritt am geringsten, beim Galopp am meisten erhöht ist. Doch ist die Steigerung des Umsatzes selbst bei ein und derselben Gangart verschieden. So

findet man, daß beim Reiten im Schritt bei gutem Reiter und ruhigem Tiere (Versuch 1 und 2) der Stoffwechsel durch 50 %, bei weniger geübtem Reiter und ruhigem Tiere (Versuch 4) dagegen um 102 %, bei gutem Reiter, aber unruhigem Tiere um 172 % gesteigert wird. Im Mittel ergibt sich ein Mehrverbrauch von 122 % oder 1,41 Cal/Minute über den Grundumsatz.

Im Trab wurde immer „leicht“ geritten, d. h. der Reiter hat sich bei jedem Stoße des trabenden Pferdes ein wenig erhoben und wieder niedergelassen. Beim leichten Trab mit etwa 170 Schritte pro Minute (Tabelle VIII) zeigt sich ein Mehrverbrauch von 339 % und 4,16 Cal/Minute. Beim gewöhnlichen gestreckten Trabe (300 Schritte pro Minute) findet man, daß bei einem guten Reiter und ruhigen Tiere in ungestörtem, gleichmäßigem Gang (Tabelle IX, Versuch 6 und 7) der Umsatz mit 456 % gesteigert ist. Zugleich ließ es sich feststellen, daß beim Traben auf dem nicht erhaltenen Fahrweg des Pferdemarktes und auf dem sandigen, weichen Boden der offenen Reitschule mit Bezug auf den Energieaufwand des Reiters kaum eine Differenz (nur 1 bis 2 %) aufzuweisen ist. Bei gutem Reiter, aber unruhigem Tiere, welches geneigt ist, öfters in Galopp einzuspringen (Versuch 4), steigt der Umsatz beim Traben stärker an. Aus den miteinander sehr gut übereinstimmenden Werten der Versuche 6 und 7 läßt sich daher der Energieumsatz bei gutem Reiter, ruhigem Pferde in gleichmäßigem, ungestörtem Trab mit einem Mehrverbrauch von 450 % oder 6,63 Cal/Minute berechnen. Als Durchschnittswert für das Traben ergab sich 6,79 Cal/Minute.

Beim kurzen Galopp in der gedeckten Reitschule mit 325 Schritten pro Minute (Tabelle X) ist der Umsatz mit 659 % höher als der Grundumsatz. Dies entspricht einem Mehrverbrauch von 7,82 Cal/Minute.

Im gewöhnlichen (Jagd-) Galopp mit 500 Schritten pro Minute ergibt sich bei einem geübten Reiter und ruhigem Tiere, ohne daß sich ein Unterschied beim Reiten auf dem Fahrweg und dem sandigen Terrain der Reitschule feststellen ließe, ein Mehrverbrauch von etwa 600 %, bei gutem Reiter, aber feurigem Roß etwa 820 %. Im Mittel zeigt sich für den Galopp ein Mehrverbrauch von 672 % oder 9,08 Cal/Minute.

Berechnet man den Energieaufwand beim Reiten nicht pro Minute, sondern pro Meter Weg, so stellt sich heraus, daß die großen Unterschiede im Umsatz bei den einzelnen Gangarten sich erstens sehr verringern, zweitens anders gestalten. Pro Minute erfordert der Galopp etwa sechsmal, der Trab viermal mehr Energieaufwand als das Reiten im Schritt. Pro Meter Weg erfordert dagegen das Traben die größte Anstrengung und etwas weniger nur der Galopp. Immerhin ist der Energieumsatz auch beim Traben nur etwa zweimal höher als beim Reiten im Schritt.

Ver- such Nr.	Bezeichnung der Bestimmung	Sack Nr.	Ver- suchs- dauer Min.	Weg pro Min. m	Pferde- schritte pro Min.	Redu- ziertes Volumen Liter	Redu- ziertes Minuten- volumen Liter	Produ- zierte CO ₂ %	Ver- brauchte O ₂ %
2	Ruheumsatz . . .	I	9	—	—	68,58	7,62	2,91	3,81
	Sitzen im Sattel .	II	6,1	—	—	48,01	7,87	2,87	3,78
	" " " " .	III	7	—	—	58,76	8,39	2,79	3,70
	Schritt " " " " .	IV	5,66	100	120	57,06	10,08	2,89	3,85
	" " " " " " .	V	5,5	120	130	71,53	13,00	2,91	3,52
	Trab " " " " " " .	VI	2,66	213	170	66,01	24,81	4,02	5,09
	" " " " " " " " .	VII	2,7	245	170	62,04	22,98	4,31	5,78
3	Ruheumsatz . . .	I	9	—	—	60,41	6,71	3,44	4,65
	Sitzen im Sattel .	II	8	—	—	72,33	9,04	3,19	4,27
	" " " " " " .	III	8	—	—	76,03	9,05	3,25	4,33
	Schritt " " " " " " .	IV	5	120	120	69,82	13,96	3,41	4,51
	" " " " " " " " .	V	4,87	123	118	71,19	14,62	3,41	4,25
	Trab " " " " " " " " .	VI	3,33	180	160	74,27	22,28	3,92	4,82
	" " " " " " " " " " .	VII	2,93	205	170	67,78	23,13	3,95	4,84
4	Galopp (kurzer) .	VIII	2,15	302	220	67,81	31,54	4,37	4,84
4	Ruheumsatz . . .	I	10	—	—	66,07	6,61	2,83	3,79
	Schritt " " " " " " .	II	4,7	111	120	66,99	14,25	3,59	4,47
	" " " " " " " " .	III	4,5	115	125	69,36	15,41	3,70	4,59
	Trab " " " " " " " " .	IV	2,1	324	300	85,96	40,94	4,04	4,44
	" " " " " " " " " " .	V	2,05	333	300	74,29	36,23	3,97	4,47
	Galopp " " " " " " " " .	VI	1,2	567	520	60,60	50,51	3,92	4,23
	" " " " " " " " " " " " .	VII	1,33	511	500	71,73	53,93	3,92	4,18
5	Ruheumsatz " " " " " " .	I	10	—	—	80,48	8,05	3,19	3,98
	Schritt " " " " " " " " .	II	4,6	113	130	57,48	12,49	3,17	3,84
	" " " " " " " " " " .	III	4,65	112	130	53,74	11,53	3,20	4,05
	Trab " " " " " " " " " " .	IV	2	260	220	62,96	31,48	3,89	4,49
	" " " " " " " " " " " " .	V	1,75	297	260	67,81	38,76	4,02	4,45
	Galopp " " " " " " " " " " .	VI	1,25	432	500	74,61	59,69	3,64	3,86
6	Ruheumsatz " " " " " " " " .	I	11	—	—	78,64	7,15	3,37	4,35
	Schritt " " " " " " " " " " .	II	4,3	118	130	59,19	13,76	3,82	4,63
	" " " " " " " " " " " " .	III	3,2	106	130	41,41	12,94	3,42	4,31
	Trab " " " " " " " " " " " " .	IV	2,5	287	230	85,92	34,38	4,23	4,99
	" " " " " " " " " " " " " " .	V	2,37	280	230	81,49	34,40	4,07	4,92
	Galopp " " " " " " " " " " " " .	VI	1,4	500	500	66,24	47,32	4,07	4,45
	" " " " " " " " " " " " " " " " .	VII	1,28	512	500	59,69	46,65	4,00	4,33
7	Ruheumsatz " " " " " " " " " " .	I	10	—	—	70,42	7,04	3,47	4,40
	Sitzen im Sattel " " " " " " .	II	7	—	—	60,37	8,62	3,57	4,84
	" " " " " " " " " " " " .	III	7	—	—	65,83	9,40	3,55	4,53
	Trab (fr. Reitsch.) " " " " " " .	IV	3,37	297	200	117,10	34,77	4,17	4,81
	" " " " " " " " " " " " " " .	V	1,63	307	200	52,89	32,45	4,20	4,92
	Trab (Fahrweg) " " " " " " " " .	VI	2,12	321	230	72,64	34,27	3,98	4,86
	" " " " " " " " " " " " " " " " .	VII	2	325	230	71,41	35,71	3,90	4,74
	Galopp (fr. Reitsch.) " " " " " " " " .	VIII	1,88	532	500	80,89	43,02	4,22	4,74
	Galopp (Fahrweg) " " " " " " " " " " .	IX	1,42	500	500	64,16	45,19	4,07	4,83

F.

Produzierte CO ₂ pro Min. ccm	Verbrauchter O ₂ pro Min. ccm	R. Q.	Umsatz pro Minute		Bemerkungen
			kg-cal	%	
222	290	0,76	1,377	100	Liegend, nüchtern
226	297	0,76	1,411	102	Das Pferd steht fast absolut ruhig, hat nur zweimal den Kopf in die Höhe geschneilt. Versuchsperson führt gar keine Bewegung mit den Händen aus
234	310	0,75	1,469	107	Ungestörter gleichmäßiger Gang
291	388	0,75	1,839	133	Nach vorherigem, 1/2 Stunde lang dauerndem Reiten im Schritt mit gleichmäßigem, ungestörtem Gang
378	458	0,83	2,213	161	Ungestörter Trab. Zeitlich nach Nr. IV bestimmt
997	1263	0,79	6,050	439	Nach vorherigem, 1/2 Stunde dauerndem Reiten im Schritt. Die Bestimmung fand zeitlich nach Nr. V statt. Ungestörtes Traben
990	1328	0,74	6,276	456	Liegend, nüchtern
231	312	0,74	1,476	100	Nach vorherigem 1/2 Std. dauerndem Sitzen im Sattel bestimmt. Das Roß etwas unruhig, mehrmals den Kopf in die Höhe geschneilt, Reiter daher nicht so ruhig wie in Versuch 2, II und III
288	386	0,75	1,829	124	Ungestörter Gang
309	411	0,75	1,949	132	Das Roß ist in gleichmäßigem, doch langsamerem Tempo gegangen, sonst ruhiger Trab
476	630	0,76	2,992	203	Ein wenig gelungener kurzer Galopp von sehr ungleicher Geschwindigkeit, während welcher das Roß mehrmals ins Traben gefallen
498	621	0,80	2,983	202	Liegend, nüchtern. Pro Stunde u. kg Körpergew.: 1,05 Cal
573	1074	0,81	5,168	350	Das Roß ist mehrmals gestiegen, konnte nur mit Anstrengung in Schritt gehalten werden
914	1119	0,82	5,401	366	Wie in II, ist außerdem dreimal in Galopp eingesprungen
1378	1526	0,90	7,518	509	Springt zweimal in Galopp, nach Zurücknahme in Trab ein regelmäßiges Traben von gleichmäß. Geschwindigkeit
187	250	0,75	1,187	100	Gleichmäßiger, regelrechter Trab, das Pferd hat bloß einmal aufgeschlagen
512	637	0,80	3,059	258	Ein ununterbrochener Galopp, in derselben Gangart von gleichmäßiger Geschwindigkeit
570	707	0,81	3,405	287	Liegend. Hat um 7h 200 g Brot und 50 g Speck gefrühstückt. Ruheumsatz 2 1/2 Std. nach Nahrungsaufnahme
1654	1818	0,91	8,971	756	Ein gleichmäßiger, ungestörter Gang
1438	1619	0,89	7,956	670	Regelmäßiger, ungestörter ruhiger Trab
1950	2136	0,93	10,590	899	Zweimal ist das Roß in Galopp eingesprungen, sonst ein gleichmäßiges Traben
2113	2254	0,94	11,209	944	Regelmäßiger, ununterbrochener Galopp
257	320	0,80	1,538	100	Nüchtern, liegend. Pro kg Körpergew. und Std.: 1,03 Cal
396	480	0,82	2,316	151	Ungestörter, gleichmäßiger Gang
370	470	0,79	2,242	146	Gleichmäßiger Trab, das Roß ist dreimal in Galopp eingesprungen
1225	1414	0,87	6,907	449	Ist gleichmäß. wie IV. Hier hat es zweimal aufgeschlagen
1558	1806	0,90	8,894	578	Regelmäßiger, ungestörter Galopp von gleicher Geschwindigkeit
2173	2252	0,94	11,192	728	Nüchtern, liegend. Pro Std. und kg Körpergew.: 1,04 Cal
241	311	0,77	1,462	100	Das Roß steht etwas unruhig, deshalb war auch die Versuchsperson nicht völlig ruhig gewesen, sondern führte mit dem Arm einige Muskelbewegungen aus
326	637	0,82	3,075	210	Roß etwas unruhig, viermal in Galopp gesprungen
443	558	0,82	2,678	183	Ungestörter, gleichmäßiger Trab
1454	1715	0,85	8,339	570	Regelmäßiges, ununterbrochenes Traben in fließendem Gang
1400	1692	0,83	8,187	560	Beide: ununterbrochener Galopp von gleichmäßigem Gang und gleicher Geschwindigkeit
1892	2106	0,90	10,370	709	
1966	2019	0,92	9,991	683	
244	310	0,79	1,484	100	
398	417	0,74	1,972	133	
334	426	0,78	2,034	137	
1450	1673	0,87	8,174	551	
1362	1597	0,85	7,762	523	
1364	1665	0,82	8,035	541	
1393	1692	0,82	8,166	550	
1816	2039	0,89	10,015	684	
1840	2182	0,84	10,583	713	

Tabelle VI.
Sitzen im Sattel.

Versuch Nr.	Rubeumsatz in kg-cal		Umsatz pro Min. kg-cal	Umsatz in %		Zunahme während des Sitzens in kg-cal		Zunahme in mkg *)		Korrektion des Rubeumsatzes %
	gefunden	kori-giert		gefunden	kori-giert	gefunden	kori-giert	gefunden	kori-giert	
1	1,346	1,187	1,546 1,417	115 105	130 119	0,200 0,071	0,359 0,230	17 6	31 20	13,3
2	1,377	1,187	1,411 1,469	102 107	118 124	0,034 0,092	0,224 0,284	3 8	19 24	16,2
3	1,476	1,139	1,829 1,949	124 132	161 171	0,352 0,473	0,690 0,810	30 40	59 69	29,5
7	1,484	—	1,972 2,034	133 137	133 137	0,488 0,550	0,488 0,550	42 47	42 47	—
			Mittel:		137		0,454		39	

*) Mit 20 % Nutzeffekt berechnet.

Tabelle VII.
Reiten im Schritt.

Versuch Nr.	Rubeumsatz in kg-cal		Umsatz pro Min. kg-cal	Umsatz in %		Zunahme während des Reitens in kg-cal		Zunahme in mkg		Korre- tion %	Mehrverbrauch pro m Weg in kg-cal	
	gefunden	kori-giert		gefunden	kori-giert	gefunden	kori-giert	gefunden	kori-giert		gefunden	kori-giert
1	1,346	1,187	2,113 2,063	157 153	189 174	0,926 0,876	0,767 0,716	65 61	79 75	13,3	0,008 0,008	0,010 0,010
2	1,377	1,187	1,839 2,213	133 161	155 186	0,652 1,026	0,462 0,836	39 71	55 87	16,2	0,005 0,007	0,006 0,008
3	1,476	1,139	2,992 2,983	203 202	263 262	1,516 1,844	1,553 1,507	129 129	158 157	29,5	0,013 0,012	0,015 0,015
4	1,187	—	3,039 3,405	258 287	258 287	1,872 2,218	1,872 2,218	160 190	160 190	—	0,017 0,019	0,017 0,019
			Mittel:		222				120		0,011	0,012

Tabelle VIII. Trab. (Gestreckte Reiterschule.)

Versuch Nr.	Ruheumsatz in kg-cal		Umsatz pro Min.		Umsatz in %		Zunahme während des Trabes in kg-cal		Zunahme in mkg		Korrektur %	Mehrverbrauch pro m Weg in kg-cal	
	gefunden	koriert	gefunden	koriert	gefunden	koriert	gefunden	koriert	gefunden	koriert		gefunden	koriert
1	1,346	1,187	4,040 5,060	243 426	2,694 3,714	2,853 3,878	230 317	244 331	13,3			0,015 0,019	0,016 0,020
2	1,377	1,187	6,050 6,276	439 510	4,673 4,899	4,863 5,089	399 418	405 434	16,2			0,022 0,020	0,023 0,021
3	1,476	1,139	5,168 5,401	454 474	3,692 3,923	4,029 4,262	315 335	344 364	29,5			0,020 0,019	0,022 0,021
			Mittel:	439		4,161		355				0,019	0,020

Tabelle IX. Trab im Freien. Ohne Korrektur, da nicht notwendig.

Versuch Nr.	Ruheumsatz in kg-cal		Umsatz pro Minute in		Zunahme in		Bemerkungen
	pro Minute	pro Std. und kg Körpergewicht	kg-cal	%	kg-cal	mkg	
4	1,187	1,05	8,971 7,956	756 670	7,784 6,769	665 578	Fahrtweg
6	1,462	1,03	8,339 8,187	570 560	6,877 6,725	587 574	"
7	1,484	1,04	8,174 7,764 8,035 8,166	551 523 541 550	6,690 6,278 6,551 6,682	571 536 559 571	Freie Reitschule
			Mittel:	590	6,794	580	Fahrtweg

Tabelle X. Kurzer Galopp.

Versuch Nr.	Ruheumsatz in kg-cal		Umsatz pro Min.		Umsatz in %		Zunahme in kg-cal		Zunahme in mkg		Korrektur %	Mehrverbrauch pro m Weg in kg-cal	
	gefunden	koriert	gefunden	koriert	gefunden	koriert	gefunden	koriert	gefunden	koriert		gefunden	koriert
1	1,346	1,187	9,062 8,961	763 755	7,717 7,615	7,875 7,774	659 650	673 664	13,3			0,022 0,023	0,023 0,024
			Mittel:	759		7,824		668				0,022	0,023

Tabelle XI.

Galopp (ohne Korrektion).

Versuch Nr.	Ruheumsatz in kg-cal		Umsatz pro Min.		Zunahme in		Mehr- verbrauch pro m Weg kg-cal	
	pro Minute	pro Std. und kg Körpergewicht	kg-cal	o/o	kg-cal	mkg		
4	1,187	1,05	10,590	899	9,403	803	0,017	Fahrweg
			11,209	944	10,022	856	0,020	
6	1,462	1,03	10,370	709	8,908	761	0,018	"
			9,991	683	8,529	728	0,017	
7	1,484	1,04	10,015	684	8,531	729	0,015	Freie Reitsch. Fahrweg
			10,583	713	9,099	777	0,018	
			Mittel:	772	9,082	776	0,018	

Tabelle XII.

Übersicht der Mittelwerte.

Bezeichnung der Bestimmung	Umsatz o/o	Mehrverbrauch pro Minute		Mehr- verbrauch pro m Weg kg-cal	R. Q.
		kg-cal	mkg		
Ruheumsatz	100	—	—	—	0,76
Sitzen im Sattel	137	0,454	39	—	0,75
Schritt	222	1,408	120	0,012	0,79
Leichter Trab	439	4,161	355	0,020	0,84
Trab	590	6,794	580	0,022	
Kurzer Galopp	759	7,824	668	0,023	0,90
Galopp	772	9,082	776	0,018	0,91

Es sei noch von Interesse, die für das Reiten gewonnenen Daten des Energieumsatzes mit jenen für andere Muskeltätigkeit erbrachten Werten zu vergleichen. *Benedict* und *Cathcart* (3) geben als eine maximale Leistungsfähigkeit bei menschlicher Arbeit am Bicycleergometer, die $4\frac{1}{2}$ Stunden lang ohne Unterbrechung dauerte, 2 kg-cal/Minute an. *Blix* (4) fand [die Werte sind von *Benedict* und *Cathcart* (l. c.) in Kalorien umgerechnet] für Bergsteigen bei anstrengender Arbeit von 1 bis 2 Stunden Dauer 1,74 bis 2,33 Cal/Minute; für Hinauflaufen über Treppen, bei einer Dauer von 30 Sekunden, 10,00 Cal/Minute. Die Ergebnisse unserer Versuche zeigen, daß beim Reiten diese Werte erreicht, sogar übertroffen werden können. Der Mehrverbrauch beim Galopp von 9,08 Cal/Minute in unseren Versuchen, in welchen das Galoppieren immer 5 bis 6 Minuten dauerte, ist daher höher einzuschätzen als der Arbeitswert von *Blix* mit 10,00 Cal/Minute, wobei aber die Arbeit nur 30 Sekunden dauerte.

Für eine gewöhnliche, nicht anstrengende Leistung eines Reiters kann man ein 2 Stunden langes Reiten annehmen. Davon sollen

$\frac{1}{2}$ Stunde aufs Traben, $1\frac{1}{2}$ Stunden aufs Reiten im Schritt entfallen. Aus unseren Mittelwerten erhält man für diese Leistung $2,75 \text{ Cal/Mi-nute}$. Doch sei bemerkt, daß es beim Reiten unter Umständen zu weit größeren Anforderungen kommen kann, dieser Wert sich dann auch höher einstellen wird.

Beim Reiten nach Nahrungsaufnahme (Versuch 5, Tabelle V) findet man im Ruheumsatz (2 Stunden nach vorhergegangenen Frühstück aus Milch, Speck und Brot) $1,36 \text{ Cal/Stunde}$ und Kilogramm Körpergewicht. Der Energieumsatz ist bei den einzelnen Gangarten des Reitens im Vergleich zu den übrigen Werten eines guten Reiters auf ruhigem Pferde über das ruhige Liegen nicht, über den berechneten und in anderen Versuchen auch tatsächlich gefundenen Wert des Grundumsatzes jedoch mit 29 % erhöht.

Die gute Übereinstimmung des Respirationsquotienten in den Doppelversuchen zeigt an, daß das Herstellen des Atmungsgleichgewichts in jedem Versuch gelang und läßt somit eine nähere Betrachtung der Respirationsquotientenwerte zu. Wie aus Tabelle XII hervorgeht, ist der Respirationsquotient im Mittel im Ruheumsatz 0,76, beim Sitzen zu Pferde nicht erhöht, bei den einzelnen Gangarten des Reitens steigt er dann entsprechend an: im Schritt 0,79, im Trab 0,84 und im Galopp 0,90. Daß diese Steigerung nicht durch eine vermehrte Ausschwemmung der Kohlensäure, sondern durch vermehrte Oxydation im Körper bedingt ist, zeigt eben die Konstanz des Respirationsquotienten sowohl in den Doppel- wie auch im Vergleich zu den übrigen Versuchen an.

Zusammenfassung.

1. Es wurde der Energieverbrauch beim Reiten durch Bestimmung des respiratorischen Gassstoffwechsels mittels der *Douglasschen* Sackmethode untersucht.

2. Es ergibt sich, daß der Energieumsatz durch das absolut ruhige *Sitzen im Sattel* mit 7 % erhöht wird, durch das gewöhnliche „ruhige“ *Sitzen zu Pferde*, wobei aber auch einige zur Beruhigung des Rosses nötige Muskelbewegungen zeitweise ausgeführt werden, dagegen mit 37 % über den Grundumsatz gesteigert wird.

3. Bei den verschiedenen Gangarten des Reitens erwiesen sich qualitativ große Unterschiede, wobei der Umsatz beim Reiten im Schritt am geringsten, beim Galopp am meisten gesteigert ist (Tabelle XII).

4. Pro Meter Weg verringern sich die Unterschiede, indem das Traben nur zweimal mehr Energieaufwand erfordert, das Galoppieren noch weniger, das Reiten im Schritt am wenigsten.

5. Der Respirationsquotient steigt bei den einzelnen Gangarten entsprechend der Anstrengung bis zu 0,91 an (Tabelle XII).

Es sei mir gestattet, für die wertvolle Anregung sowie gütige Förderung dieser Versuche dem Herrn Prof. *G. Farkas* meinen innigsten Dank auch hiermit auszusprechen.

Literatur.

1) *C. G. Douglas*, Journ. of Physiol. **42**, 17, 1911. — 2) *J. Geldrich* und *M. Heksch*, Zeitschr. f. klin. Wochenschr. **104**, 618, 1926. — 3) *Fr. G. Benedict* und *E. P. Cathcart*, Muscular work Carnegie Inst. Washington **187**, 161, 1913. — 4) *Blix*, Skand. Arch. Phys. **15**, 122, 1904; zitiert nach *Benedict* und *Cathcart*.

Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute.

IX. Mitteilung:

Der Zusammenhang des Blutammoniaks mit der Muskularbeit¹.

Von

J. K. Parnas, Wł. Mozołowski und W. Lewiński.

[Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Lwów (Lemberg).]

(Eingegangen am 13. Juni 1927.)

Die Untersuchungen über das Blutammoniak, die von *Parnas*, *Heller*, *Taubenhaus*, *Klisiecki* und *Mozołowski*² in den letzten Jahren veröffentlicht worden sind, haben es nicht vermocht, über die Herkunft des im kreisenden Blute enthaltenen Ammoniaks Klarheit zu verschaffen; dasselbe gilt auch für die Arbeiten anderer Forscher, die sich in den letzten Jahren mit derselben Frage beschäftigt haben (*Adlersberg* und *Taubenhaus*³, *Bliss*⁴, *Fontés* und *Jovanovitch*⁵). Die von *Parnas* und *Heller* aufgedeckte Quelle der Ammoniakbildung im Blute ist jedenfalls bei einer Reihe von Tieren (Pferd, Rind, Hund, Katze) sehr geringfügig; eine andere Quelle bildet die (beim Kaninchen sehr bedeutende) Ammoniakbildung im Blinddarm und Dickdarm, die als enterogene Ammoniakbildung von *Nencki* und *Zaleski* entdeckt⁶,

¹ Zugleich III. Mitteilung über Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. Vgl. *Parnas* und *Mozołowski*, diese Zeitschr. **184**, 399, 1927; Klin. Wochenschr. **6**, 998, 1927.

² Diese Zeitschr. **152**, 1, 1924; **155**, 247, 1925; **159**, 298, 1926; **169**, 255, 1926; **172**, 442, 1926; **178**, 229, 1926; **181**, 80, 1926; **181**, 85, 1926; C. r. Soc. Biol. **91**, 701, 1924; Bull. Soc. Chim. Biol. **9**, 76, 1927.

³ Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **118**, 1, 1926.

⁴ Journ. of Biol. Chem. **67**, 117, 1926.

⁵ Bull. Soc. Chim. Biol. **7**, 1044, 1925; C. r. Soc. Biol. **92**, 1406.

⁶ *Nencki* und *Zaleski*, Arch. f. exper. Pathol. **86**, 385, 1895; **87**, 26, 1896; Zeitschr. f. physiol. Chem. **83**, 193, 1901; *Horodyski*, *Zaleski* und *Salaskin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 246, 1902.

dann von *Folin* und *Denis*¹ sowie *Henriquez* und *Hansen*² studiert worden ist; sie wurde von *Parnas* und *Klisiński*³ auf der Grundlage neuer Methoden und neuer Grundwerte auch als Ammoniakquelle bei der hypoxämischen Ammonämie des Kaninchens festgestellt, und in den schönen Versuchen von *A. D. Cholopoff*⁴ an angiotomierten Hunden nach *London* wurden für ihren Betrag Werte gefunden, die den in vivo beim Hund vorkommenden wahrscheinlich am nächsten liegen. Ob dagegen in vivo eine Ammoniakbildung in den Geweben und Übertritt von Ammoniak aus den Geweben ins Blut vorhanden ist, darüber ist aus dem bis jetzt vorliegenden Material nichts Sicheres zu entnehmen. Es sind nur wenige Versuche beschrieben, in welchen das Ammoniak mittels sicherer Methoden in arteriellem und venösem Blute — vom Portalblut abgesehen — an einem und demselben Tiere und zu gleicher Zeit bestimmt wurde. *Parnas* und *Klisiński*⁵ finden in solchen Versuchen am Kaninchen und am Hunde ebensoviel oder mehr Ammoniak im Blute der V. jugularis oder der V. femoralis, als im Blute der A. Carotis; doch sind die Unterschiede gering. Einen sicheren Mehrgehalt an Ammoniak finden sie im Blute der V. uterina des trächtigen Kaninchens. *Bliss*⁶ erhält meist höhere Werte für das venöse Blut des Hundes als für das arterielle, doch glauben wir nicht, daß seine Methode, die ihm für das Blut der Femoralarterie des normalen Hundes bis 0,21 mg-% $\text{NH}_3\text{-N}$ liefert, und die auf die Ammoniakbildung im isolierten Blute keine Rücksicht nimmt, für die Entscheidung der Frage nach der Ammoniakbildung in den Geweben fein genug war⁷.

¹ *Folin* und *Denis*, Journ. of biol. Chem. **11**, 161, 517, 1912.

² *Henriquez* und *Hansen*, diese Zeitschr. **78**, 297, 1917; **80**, 297, 1918.

³ Ebendasselbst **178**, 224, 1926.

⁴ *Pflügers Arch.* **214**, 320, 1926.

⁵ Diese Zeitschr. **172**, 442, 1926.

⁶ Journ. of biol. Chem. **67**, 103, 1926. Die Versuche von *Fontés* und *Jovanovitch*, welche auf Grund von drei Bestimmungen am arteriellen Blute und fünf Bestimmungen am venösen Blute, wobei jede Blutprobe von der vollständigen Entblutung eines anderen Hundes stammte, an der Behauptung festhalten, das venöse Blut enthalte weniger Ammoniak als das arterielle, erwähnen wir der Vollständigkeit wegen. (*Bull. de la Société de chim. biol.* **7**, 1044, 1925; **8**, 417, 1926; vgl. *Parnas*, ebendasselbst **9**, 76, 1927.)

Es sei jedoch in diesem Zusammenhang noch besonders hervorgehoben, daß *A. Bornstein* und *K. Keitel* in Versuchen an durchbluteten Hundemuskeln finden, daß die Muskulatur instande ist, den hohen Ammoniakgehalt des Durchblutungsblutes herabzudrücken; sie finden eine Abnahme von 1,42 bis 2,8 mg $\text{NH}_3\text{-N}$ für 1 kg Muskel und die Stunde. Es scheint uns nicht leicht, dieses Resultat physiologisch zu deuten und die Autoren äußern sich auch sehr zurückhaltend. (Diese Zeitschr. **179**, 117 bis 124, 1926.)

⁷ Vgl. diese Zeitschr. **173**, 238, 1926.

Durch die Entdeckung, daß im Muskel bei Tätigkeit eine bedeutende Ammoniakbildung stattfindet¹, wurde unsere Aufmerksamkeit auf die Muskulatur als mögliche Quelle des Blutammoniaks gerichtet. Wir haben, in Verfolgung der Beobachtungen von *Parnas* und *Mozolowski*, am isolierten Froschmuskel gefunden, daß die Ammoniakbildung im Froschmuskel dem Produkt aus der entwickelten Spannung in die Muskellänge genau proportional ist, sowohl unter anoxybiotischen als unter oxybiotischen Bedingungen, sowohl in frischen als in ermüdeten Muskeln, daß die Ammoniakanhäufung in arbeitenden Froschmuskeln weder reversibel ist, noch durch irgend einen Vorgang beseitigt wird, daß das im Muskel gebildete Ammoniak in die sauerstoffgesättigte Ringerlösung übergeht; das alles ließ erwarten, daß aus dem arbeitenden Muskel auch *in vivo* Ammoniak in das venöse Blut übergeht. Sollte dies festgestellt werden, so hätten wir ein wichtiges Glied in der Beweisführung über die Rolle der Ammoniakbildung im chemischen Geschehen der Muskeltätigkeit gegenüber Zweifeln und Mißdeutungen², welche gegen die aus Versuchen an isolierten Organen erhaltenen Resultate und Schlüsse immer noch erhoben werden.

Wir haben die Versuche über die Frage, ob aus dem arbeitenden Muskel Ammoniak ins Blut übertritt, in der denkbar einfachsten Versuchsanordnung am Menschen angestellt. Den Versuchspersonen, die sich zur Verfügung stellten, meist Studenten und Studentinnen der Medizin, wurde aus der V. cubiti obliqua oder aus anderen Ellenbogenvenen Blut bei möglicher Muskelruhe und bei intensivster Arbeit der Muskeln der Hand und des Unterarms entnommen und der Ammoniakgehalt bestimmt. Bei dieser Versuchsanordnung analysiert man zwar kein reines Muskelblut, die Frage der adäquaten Reizung und der Sauerstoffversorgung macht aber dafür keine Sorge und man kommt den Verhältnissen im lebenden Organismus am nächsten.

Die Versuchspersonen saßen bequem, mit aufgestütztem Arm, die Blutentnahme erfolgte mittels einer dichten, mit flüssigem Paraffin ausgegossenen Rekordspritze und Nadeln Nr. 2, ohne Stase; höchstens wurde in den Ruheversuchen im Moment des Einstechens der Nadel die Vene zentral von der Einstichstelle mit dem Finger zugedrückt, dann sofort freigelassen. In den Arbeitsversuchen bekam die Versuchsperson einen Klumpen von etwa 500 g Plastellin, den sie angestrengt durchkneten mußte, unter Arbeit aller Finger; dies schien geeignet zu sein, um alle Muskeln der Hand und des Unterarms spielen zu lassen. Nachdem diese Arbeit eine bestimmte Zeit lang geleistet worden ist, drückte die Versuchsperson den Klumpen krampfhaft zusammen und währenddessen wurde wieder Blut entnommen.

¹ *Parnas* und *Mozolowski*, diese Zeitschr. 184, 399, 1927; Klin. Wochenschrift 6, 998, 1927; *Emden*, ebendaselbst 6, 628, 1927.

² Z. B. *Fontés*, Bull. de la Société de chim. biol. 8, 417, 1926.

Das Blut wurde sofort aus der Spritze in den bereits evakuierten Apparat zur Ammoniakbestimmung (in der endgültigen Form nach *Parnas* und *Klisiecki*¹) gebracht; es wurde keine gerinnungshemmende Substanz zugefügt, dagegen befand sich Natriumoxalat in der Boratlösung und war durch Destillation mit dieser ammoniakfrei gemacht. Es wurden meist 5 ccm Blut analysiert, 2 ccm nur in einigen Fällen, wo Entnahme größerer Mengen nicht möglich war. Bei Verwendung von 5 ccm Blut und einem Ammoniakgehalt von 0,02 bis 0,2 mg-% Ammoniak-N ist die kolorimetrische Ammoniakbestimmung besonders genau.

Die in einigen Versuchen angeführten Werte für den Sauerstoffgehalt und die Sauerstoffkapazität des Blutes wurden nach der Methode von *Haldane* bestimmt².

Die in Tabelle I zusammengestellten Werte zeigen in eindeutiger Weise, daß aus dem arbeitenden Muskel ammoniakreicheres Blut abfließt als aus dem ruhenden. Der Vergleich ist überaus anschaulich, wenn man in einem Versuch den Ruhewert und den Arbeitswert bestimmt und beide, mit *Nesslerschem* Reagens versetzten Proben nebeneinander betrachtet. In keinem einzigen Falle haben wir im Arbeitsversuch und im Ruheversuch gleiche Werte, oder gar im Arbeitsversuch geringere Werte gesehen.

Wenn die Versuchspersonen angestrengt kräftig arbeiteten, so war der Ammoniakgehalt im Blute aus dem arbeitenden Unterarm dreimal so hoch als aus dem ruhenden, es kamen aber auch Werte vor, die sechs- bis achtmal so hoch waren als die Ruhewerte. Wir suchten nach einer Erklärung dieser Unterschiede, die nicht auf kräftigere oder schwächere Arbeit zurückzuführen waren, denn die Personen I, II, III waren sehr kräftige Männer, die im Versuch sehr energisch gearbeitet hatten. Es fielen konstitutionelle Unterschiede zwischen den Versuchspersonen auf: die Versuchspersonen I, II und III waren asthenisch-athletische Personen mit dünner, blasser Haut, mit einem hervortretenden Venennetz, das während der Arbeit mit Blut prall anschwellt; die Versuchspersonen IV, VI, VIII entsprachen dem pyknischen Typus, mit zarteren Venen, die nicht deutlich hervortraten. Wir nahmen zunächst an, daß in den beiden Typen der Unterschied im Ammoniakgehalt des venösen Blutes aus dem arbeitenden Arme darin bestehen könnte, daß bei den athletisch-asthenischen Typen der arbeitende Muskel durch einen verhältnismäßig kräftigeren Blutstrom versorgt wird als bei den pyknischen, und dies schien auch die Bestimmung des Sauerstoffdefizits im venösen Blute zu bestätigen. Versuchsperson I zeigte während der Arbeit ein kaum größeres Sauerstoffdefizit als in der Ruhe und das war schon an der Farbe des Blutes zu sehen. Die Versuchspersonen V, VII, IX und X haben nicht sehr kräftig gearbeitet. Die Versuchsperson XI, ein kräftiges, leichtathletisches Mädchen, bei dem die Hautvenen nicht besonders hervortreten, ergab die höchsten Ruhewerte, die bei thermischer Hyperämie nicht anstiegen, zeigte bei der Arbeit ein kleines Sauerstoffdefizit und die höchsten Ammoniakwerte im Blute.

Die individuellen Unterschiede im Ammoniakanstieg im Blute der Cubitalvene dürften darin ihre Erklärung finden, daß bei verschiedenen Personen durch die Verschiedenheiten des Venennetzes und der Anastomosierungen zwischen den Muskelvenen und den Haut-

¹ Diese Zeitschr. 178, 227, 1926.

² *Douglas* und *Priestley*, Human, Physiol. (Oxford).

Tabelle I.

Nr.	Datum	Versuchsperson, Name, Beruf	Alter, Geschlecht	Ammoniak- gehalt des Blutes bei Muskelruhe mg-% NH ₃ -N	Dauer der Arbeit	Ammoniak- gehalt des Blutes nach Arbeit mg-% NH ₃ -N	Sauerstoff- kapazität des Blutes Vol.-%	Sauerstoff- defizit des Blutes Vol.-%	Bemerkungen
1	7. V.	W. Morozowski (Dr. med.) . . .	32 ♂	0,025	6' 3'	0,11 0,09	20,1	10,7	1 Blut aus d. link. Hand bei ar- beitender rechter 2 Heißes Wetter Versuchsperson son. gibt an, schwächer ge- arbeitet zu hab., als am 10. V. 3 Sehr schwache Arbeit!
2	9. V.	W. Lewinski (Dr. med.) . . .	29 ♂	0,038 0,032	4' 6'	0,09 0,082	19,5	13,5	
3	10. V.	J. Nuckowski (Laborant) . . .	35 ♂	0,03	6' 6'	0,096 0,025 ¹ 0,081			
4	10. V. 18. V.	A. Heller (Frl. Frau, stud. med.)	32 ♀	0,021	6' 6'	0,194 0,12 ²			
5	10. V.	Z. Mokłowska (Witwe, Beamtin)	53 ♀	0,020	3'	0,044 ³			
6	11. V. 23. V.	M. Ziłkiewicz (stud. med.) . .	21 ♂	0,032	5' 5'	0,17 0,184	19,5	15,5	
7	11. V.	Petryński (stud. med.) . . .	18 ♂	0,021	5'	0,057			4 Arm 2' bei 45° (Wasser)
8	11. V.	C. Lutwak (stud. med.) . . .	17 ♀	0,029	5'	0,18	22,4	18,5	
9	11. V.	M. Leaczynj (stud. med.) . . .	19 ♀	0,021	5'	0,096			
10	23. V.	F. Vogel (stud. med.) . . .	20 ♂	0,015	5'	0,085			
11	13. V. 19. V. 13. V.	St. Lesser (stud. med.) . . .	20 ♀	0,04	5' 4'	0,072 0,254 0,22	21,7	12,7	
				0,04 ⁴					

venen das Blut der Cubitalvene verschiedene Mischungen des Muskelblutes und des Hautblutes darstellt; daß andererseits die Anpassung des Blutstroms an die Muskelarbeit in den Muskelgefäßen und den Hautgefäßen bei verschiedenen Personen auch individuell verschieden ausfällt, und daß bei den einen ein stärkerer Blutstrom — geringeres Sauerstoffdefizit — das Ammoniak wegpült und verdünnt. Wir glauben, daß wir bei Versuchsperson XI aus der Cubitalvene ein Blut entnehmen, welches dem reinen Muskelblut näher kommt als bei allen anderen Versuchspersonen.

Um zu prüfen, ob sich die Ammoniakproduktion bei der Muskel-tätigkeit am Ammoniakgehalt des Blutes der Kreislaufgebiete geltend macht, die nicht direkt von den arbeitenden Organen beeinflusst werden, haben wir Versuche angestellt, in welchen Armvenenblut bei angestrengtem Schnellauf an Ort und Stelle („standing running“) untersucht wurde.

1. *E. Haak*, 20 Jahre alt, stud. med. (läuft 100 m in 12 Sekunden). Versuch vom 12. Mai. Ruhe: Blut der Cubitalvene enthält 0,022 mg-% NH_3 -N. Nach 65 Sekunden „standing running“: Blut der Cubitalvene enthält 0,027 mg NH_3 -N.

2. *St. Cwynar*, 20 Jahre alt, stud. med. (läuft 100 m in 12 Sekunden). Ammoniakgehalt in der Ruhe: 0,025 mg-%. Nach 65 Sekunden „standing running“, sichtlich angestrengter als Versuchsperson I, 0,05 mg-% NH_3 -N.

Es ist aus diesen orientierenden Versuchen zu ersehen, daß auch bei kurzer, angestrengter Muskeltätigkeit, wie beim Schnellauf, nur unbedeutende Erhöhungen des Ammoniakgehalts im Blute auftreten, sofern nicht das Blut der arbeitenden Muskeln in Frage kommt; die von der Muskulatur entwickelten Ammoniakmengen werden, anscheinend ähnlich wie etwa die vom Darm kommenden, durch die Tätigkeit der Leber und vielleicht auch eines anderen Organs, zum größten Teile beseitigt.

Nach Schwankungen des nichtkolloiden Stickstoffs oder des Harnstoffs haben wir in diesen Versuchen nicht gesucht; bei der absoluten Höhe ihrer Werte im Blute waren sichere Resultate kaum zu erwarten. In den Versuchen von *Feigl*¹ und *Rakestraw*², in welchen der Reststickstoff nach Märschen und längeren Übungen untersucht und erhöht gefunden wurde, sind doch komplizierende Momente, wie Schwitzen, Wasserwechsel im Spiele; dies gilt für die Armeemarschversuche von *Feigl*; *Rakestraw* findet in seiner gründlichen Arbeit bei kurzen Laufversuchen keine Erhöhung des Reststickstoffs und des Harnstoffgehalts.

Die Feststellung, daß vom arbeitenden Muskel ein ammoniakreicheres Blut abfließt als vom ruhenden, beweist jedenfalls, daß die Ammoniakbildung, die von *Parnas* und *Mozołowski* im isolierten Muskel

¹ *Feigl*, diese Zeitschr. **76**, 297, 1916.

² *Rakestraw*, Journ. of biol. chem. **47**, 565, 1921.

gefunden worden ist und die sich als ein dem Energieumsatz proportionaler, nicht umkehrbarer Vorgang erwiesen hat, auch unter natürlichen Bedingungen im menschlichen Organismus stattfindet, und daß das gebildete Ammoniak ins Blut abfließt. Ob daneben im Muskel, der im Verband des Organismus arbeitet, auch Harnstoffbildung stattfindet, ist nicht bekannt, und die Frage müßte erst experimentell geprüft werden; was früher aus Versuchen an partiell entlebten Tieren¹ als Beweis dafür angeführt worden ist, dürfte heute besonders nach den Versuchen von *Mann* und *Magath*², schwerlich als solcher gelten können.

Folgende Überschlagsrechnung mag ein Bild von dem Ausmaß der Ammoniakbildung bei Muskularbeit geben: Versuchsperson XI wiegt etwa 63 kg, ihr Unterarm hat das Volumen von 1000 ccm. Nach Bestimmungen von *Hewlett* und *Zwaluwenburg*³ wollen wir für die Blutzufuhr bei Arbeit für 100 g Organ einen Mittelwert von 15 ccm Blut in der Minute annehmen; für den Unterarm (mit Hand von Person XI) also 172,5 in der Minute und rund 10 l in der Stunde. Dies würde bei dem Überschuß des Ammoniakgehalts bei Arbeit über Ruhe in der Stunde 20 mg $\text{NH}_3\text{-N}$ bedeuten, wenn Hand und Unterarm mit etwa 700 g Muskel eine Stunde lang schwer arbeiten. Dies könnte, wenn das Ammoniak nicht abfließen würde, eine Anhäufung von etwa 3 mg-% Ammoniakstickstoff im Muskel bewirken; wir finden diesen Wert meist in isolierten oder *in situ* belassenen Froschmuskeln, die bis zur Ermüdung gereizt worden sind. Dies ist selbstverständlich eine ganz lose Überschlagsrechnung, die Übereinstimmung der Größenordnungen sei aber hervorgehoben.

Die Frage nach der Beeinflussung des Stickstoffumsatzes durch Muskularbeit muß nach den Befunden von *Parnas* und *Mozolowski* sowie den unseren anders beantwortet werden, als dies bis jetzt möglich war. Nachdem durch den Versuch von *Fick* und *Wislicenus*, sowie die Forschungen von *C. Voit*, die *Liebigsche* Lehre vom Eiweiß als Quelle der Muskelenergie widerlegt wurde, und die Gesamtheit der Erfahrung der Stoffwechselforschung sowie der Erforschung der chemischen und energetischen Vorgänge im Muskel die stickstofffreien Nährstoffe als Quelle der Muskelenergie ins volle Licht setzten, hat man den Stickstoffumsatz des Muskels wenig beachtet; trotzdem haben Forscher, besonders *Rubner*⁴ und *Cathcart*⁵ klar erkannt, daß aus den vorhandenen Daten eine sichere, wenn auch geringe Erhöhung der Stickstoffausscheidung

¹ Z. B. *Mathews* und *Nelson*, Journ. of biol. chem. **19**, 229, 1914.⁵

² *Mann* und *Magath*, Ergebn. d. Physiol. **23**, I, 250, 1924.

³ Zitiert nach *Tigerstedt*, Physiologie des Kreislaufs **4**, 311, 1923.

⁴ *M. Rubner*, Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., **89** 1910; *C. Thomas*, ebendasselbst **249**, 1910.

⁵ *Cathcart*, Physiol. Rev. **5**, besonders 236 bis 242, 1925.

durch Muskeltätigkeit hervorgeht. *Rubner*, der sich auf Versuche von *Thomas* stützt, in welchen das Stickstoffminimum bei Arbeit von 105000 bis 136000 kg täglich von 2,27 auf 2,94 g N pro Tag stieg, faßte die Erhöhung des Stickstoffumsatzes durch Muskelarbeit als Steigerung der *Abnutzungsquote* auf. *Cathcart*, der mit *Burnett* Versuchsreihen über die Beeinflussung des Stickstoffumsatzes durch Muskelarbeit bei verschiedenen Diäten ausgeführt hat, scheint die Steigerungen, die er sicher, und zwar im Gegensatz zu anderen Forschern, erkannte, als gesteigerte Eiweißzersetzung im arbeitenden Muskel aufzufassen. Er sagt: „Es sei wirklich erstaunlich, daß die Tatsachen auf einen Eiweißumsatz von so geringer Größe im tätigen Muskel hinweisen“. Aus der Feststellung der Ammoniakbildung im arbeitenden Muskel, des Austritts des entstandenen Ammoniaks ins Blut, der Ammoniakentstehung bei Zustandsänderungen des Muskels entwickelt sich jedoch ein neues Bild von dem Anteil des Stickstoffumsatzes an den chemischen Vorgängen im Muskel; es entfallen die Annahmen, welche darin nur eine Erhöhung der Abnutzungsquote des Gewebseiweißes sehen, auch in der von *Cathcart* angedeuteten Vorstellung, in welcher ein Zusammenhang der gesteigerten Abnutzung mit dem Anteil der Proteine an den Neutralisationen im Muskelprozeß vermutet wird. Die Ammoniakbildung im Muskel ist ein Prozeß, der zwar zum Stoff und Energieumsatz nicht selber nennenswerte Energiemengen beitragen kann, der aber mit der Umsetzung der Energie gesetzmäßig, mit dem Kohlehydratumsatz ebenfalls gesetzmäßig, wenn auch nicht stöchiometrisch, zusammenzuhängen scheint: ob als intermediär auftretendes, katalytisch wirkendes Zwischenglied, oder als Zersetzungsprodukt eines solchen, als im Gewebe tätiges Hormon, oder als mit den Reaktionsschwankungen zusammenhängender Faktor, darüber können wir beim heutigen Stande der Kenntnisse nur Vermutungen aussprechen.

Zusammenfassung.

Es wird der Ammoniakgehalt des Blutes aus Cubitalvenen des Menschen bei Ruhe und bei Arbeit des Unterarms untersucht. In allen Fällen wird der Ammoniakgehalt bei Arbeit bedeutend erhöht gefunden; im Verhältnis zur Ruhe in einem Falle (bei sehr schwacher Arbeit) doppelt, in den meisten Fällen drei- bis vierfach, in mehreren Fällen sechs- bis achtfach.

Die individuellen Unterschiede in der Steigerung werden in dem Sinne gedeutet, daß der Ammoniakgehalt des Venenblutes nicht nur mit der — wahrscheinlich der Größe der geleisteten Arbeit proportionalen — Ammoniakbildung im Muskel zusammenhängt, aber auch mit der Größe des Blutstroms, durch den die ausgespülten Produkte verdünnt werden, und den individuellen Variationen des Hautvenen-

netzes und seiner Anastomosierungen mit den tiefen Venen — den Muskelvenen — des Unterarms.

Selbst sehr angestrenzter Schnellauf bedingt keine erhebliche Steigerung des Ammoniakgehalts im Blute, das aus der Cubitalvene entnommen wird.

Die Feststellung des Übertritts von Ammoniak aus dem arbeitenden Muskel ins strömende Blut bestätigt die von *Parnas* und *Mozolowski* am isolierten Muskel und am Kaltblüter gemachten Beobachtungen über den Zusammenhang zwischen Muskularbeit und Ammoniakbildung und stellt eine Anwendung jener Beobachtung auf die Physiologie des Menschen und des höheren Tieres dar.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der *Ella-Sachs-Plotz-Foundation* ausgeführt, und wir danken dem Direktorium auch an dieser Stelle für die Spende.

Über die Unwirksamkeit des direkt in den Darm eingeführten Insulins und Versuche zu deren Erklärung.

Von

Arenka Stasiak.

(Aus dem pharmako-therapeutischen Laboratorium der Universität Amsterdam.)

(Eingegangen am 23. Juni 1927.)

Von verschiedenen Autoren wurden wiederholt Versuche angestellt über die Wirkung per os gegebenen Insulins. Derartige Versuche fielen größtenteils negativ aus oder hatten höchstens einen zweifelhaften Erfolg. Vor kurzem hatten *Lasch* und *Priegel*¹ bzw. *Lasch* und *Brügel*² von positiven Ergebnissen bei gleichzeitiger Darreichung von Insulin und Saponin berichtet, aber diese Resultate konnten im hiesigen Institut durch zahlreiche Versuche auch mit größeren Insulinmengen nicht bestätigt werden³. Am deutlichsten schien ein Erfolg bei Versuchen, bei denen das Insulin direkt in das Darmlumen gebracht wurde, entweder mittels Duodenalsonde (*Burgess* c. s.⁴, *Murlin* c. s.⁴), oder durch eine Darmfistel (*Fisher*⁴, *de Jongh* und *Planelles*⁴). Hierbei dienten meistens Hunde als Versuchstiere.

Da das Kaninchen wohl mit Recht als eins der insulinempfindlichsten Tiere gilt, stellten wir eine Versuchsreihe an, um zu sehen, ob bei diesen Tieren unmittelbar in den Dünndarm gebrachtes Insulin eine Wirkung auf den Blutzucker hat. Hierzu wurden Kaninchen mit abschraubbarem Bauchfenster (nach *Cori*⁵) benutzt.

Das Bauchfenster wurde bei Tieren, die 24 Stunden hungerten, in Äthernarkose eingesetzt. Zu den Darmversuchen wurden die Tiere frühestens

¹ Med. Klin. 41, 1587, 1926.

² Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 120, 145, 1927.

³ *Dingemanse* und *Laqueur*, erscheint ebendasselbst.

⁴ Referiert nach der Monographie über Insulin von *A. Grevenstuk* und *E. Laqueur*, München, Verlag Bergmann, 1925.

⁵ *C. F. Cori*, *G. T. Cori* und *G. W. Pucher*, Journ. of Pharm. a. exp. Ther. 21, 377, 1923.

48 Stunden nach der Operation verwendet; jedenfalls nach mindestens 48 Stunden Hungern. Nach Abschrauben des Bauchfensters wurde eine Dünndarmschlinge hervorgeholt (meistens mittlere Dünndarmteile, nie Duodenum), ein etwa 30 cm langes Darmstück an beiden Seiten abgeklemt und in diese Schlinge 2 bis 4 ccm in $n/100$ HCl gelöstes Insulin (Neerlandicum Organon Nr. 435) (1 ccm = 20 Einheiten) eingespritzt. Nachher wurde das Bauchfenster wieder geschlossen. Bei einigen dieser Versuche wurde während dieses Verfahrens das Kaninchen oberflächlich narkotisiert mit Äther, bei den späteren Versuchen wurde jede Narkose weggelassen. Blut wurde aus einer Ohrvene entnommen unmittelbar vor Öffnen des Bauchfensters und dann alle Stunden bis 4 Stunden nach der Injektion des Insulins in den Darm. Der Blutzucker wurde nach *Hagedorn-Jensen* bestimmt in der *Dresel-Rothmannschen* Modifikation.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle I zusammengefaßt. Im ganzen kamen neun Kaninchen in elf Versuchen zur Untersuchung. Es wurden 40, meist 80 (intern.) Einheiten gegeben, also Mengen, wovon bei subkutaner Gabe der 120. bzw. 240. Teil reichlich genug wäre, um eine starke Blutzuckersenkung hervorzubringen, ja schon oft etwa der 1200. bzw. 1600. Teil genügte, um außerhalb der Fehlergrenze liegende Schwankungen zu erzwingen. [Siehe die Untersuchungen über den Schwellenwert des Insulins von *Laqueur* und *de Jongh*¹, in denen ein Zehntel der damals üblichen Einheit (= ein Drittel Krampfgrenzdosis) den Schwellenwert darstellte.]

Tabelle I.

Bauchfensterkaninchen; Insulin in eine abgekleimte Dünndarmschlinge.

Nr.	Gewicht g	Insul. (intern) Einb. in 4 ccm n/100 HCl gelöst	Blutzucker ‰ vor der Injektion	Blutzucker ‰				Bemerkungen
				1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.	
				nach der Injektion				
III	2350	80	0,126	0,088	0,067	—	—	2 Std. nach der Injektion Bauchfenster herunter gefallen, exitus
V	3100	80	0,132	0,120	0,098	0,100	0,101	3 Std. nach der Injektion komatös. Zustand. 4 Std. nach d. Injektion exitus. Sektion allgem. Cyanose
VI	2380	40	0,227	0,300	0,309	0,343	0,301	Exitus während der Nacht
VII	3150	40	0,165	0,211	0,278	0,336	0,301	6 Std. nach der Injektion exitus. Sektion 6
807	1750	80	0,108	0,059	0,039	0,028	0,029	
119	2600	80	0,102	0,159	0,225	0,189	0,206	
119		80	0,163	0,171	0,175	0,141	0,133	Darmschlinge nicht ab- gekleimt
29	2700	80	0,111	—	0,174	0,229	0,238	Ebenso
29		80	0,115	0,147	0,212	0,243	0,243	
VIII	2000	80 *	0,086	0,078	0,108	0,125	0,143	* Insulin in $\frac{1}{15}$ mol. Na ₂ HPO ₄ gelöst
113	1900	80 *	0,098	0,088	0,097	0,098	0,103	

¹ Diese Zeitschr. 163, 344, 1925.

Wie wir in der Tabelle I sehen, kam es zur ausgesprochenen Hypoglykämie nur einmal bei Tier Nr. 807, dagegen in sechs Versuchen zur deutlichen Hyperglykämie, und in drei Versuchen zeigen die Blutzuckerwerte wohl keine außerhalb der Fehlergrenze liegende Abweichungen.

Es wäre möglich, daß die Blutzuckererhöhung durch den Eingriff an sich verursacht wurde, darum wurden zweierlei Kontrollversuche gemacht, wo unter ganz denselben Bedingungen (meistens mit leichter Äthernarkose) entweder nur 0,9% NaCl oder nur n/100 HCl in eine abgeklemmte Dünndarmschlinge eingespritzt wurde.

Tabelle II.

Kontrollversuche am Bauchfensterkaninchen; 0,9%iges NaCl in eine abgeklemmte Dünndarmschlinge eingespritzt. Sämtliche Tiere haben vor dem Versuch 24 bis 48 Stunden gehungert.

Nr.	Gewicht g	0,9%iges NaCl ccm	Blutzucker ‰ vor der Injektion	Blutzucker ‰			
				1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.
				nach der Injektion			
29	2700	5	0,100	0,111	0,110	0,115	0,100
VIII	2000	4	0,122	0,108	0,103	0,100	0,092
113	1900	4	0,112	0,100	0,092	0,096	0,097
IX		4	0,109	0,104	0,114	0,109	0,100
X		4	0,076	0,086	0,113	0,137	0,147
XI		4	0,072	0,089	0,067	0,072	0,068

Tabelle III.

Kontrollversuche am Bauchfensterkaninchen; n/100 HCl, sonst wie Tabelle II.

Nr.	Gewicht g	n/100 HCl ccm	Blutzucker ‰ vor der Injektion	Blutzucker ‰			
				1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.
				nach der Injektion			
VIII	2000	4	0,122	0,175	0,214	0,246	0,193
113	1900	4	0,115	0,169	0,225	0,222	0,211
IX		4	0,126	0,153	0,188	0,189	0,173
X		4	0,144	0,150	0,155	0,140	0,143
XI		4	0,064	0,102	0,124	0,112	0,069

Aus Tabelle II ersehen wir, daß 4 ccm 0,9%iges NaCl keinen Einfluß auf den Blutzucker ausübt, dagegen aus Tabelle III, daß es nach dem Einspritzen von 4 ccm n/100 HCl in den Darm zu einer Blutzuckererhöhung kommt.

Eine Ausnahme bildet Kaninchen Nr. X, bei welchem sich nach Salzsäureeinspritzung der Blutzucker kaum ändert, während es mit 0,9%igem NaCl zu einer Erhöhung kam.

Aus diesen Kontrollversuchen möchten wir auf die interessante und scheinbar wenig beobachtete Tatsache hinweisen, daß Salzsäure, schon in einer Konzentration von $n/100$, vom Dünndarmkanal aus eine deutliche blutzuckersteigernde Wirkung hat.

Um über das Schicksal des Insulins in der abgeklemmten Dünndarmschlinge einen Aufschluß zu bekommen, wurde bei den Kaninchen aus Tabelle I, 4 Stunden nach Einbringen des Insulins, vor der Abnahme der Klemmen, der Inhalt der Darmschlinge ausgesogen bzw. mit 0.9%igem NaCl ausgewaschen und diese gesamte Flüssigkeit je einem Hungerkaninchen subkutan eingespritzt. Wir hätten gern für jeden Inhalt mehrere Tiere benutzt, aber die zu erwartenden Mengen Insulin waren zu gering; andererseits dient jeder Versuch als Kontrolle des anderen. Diese Versuche finden wir in der Tabelle IV zusammengefaßt.

Tabelle IV.

Kaninchen subkutan eingespritzt mit dem Inhalt der abgeklemmten Darmschlingen der Bauchfensterkaninchen; Darminhalt entnommen 4 bis 5 Stunden nach dem Einbringen des Insulins.

Nr.	Gewicht g	Menge des Darminhalts aus	Blutzucker ‰ vor der Injektion	Blutzucker ‰		Bemerkungen
				2 Std.	4 Std.	
				nach der Injektion		
2	2050	Kaninchen Nr. III, 4 ccm	0,101	0,041	—	Krampf. 4 g Dextrose sub- kutan
285	2700	Kaninchen Nr. V, 4 ccm	0,094	0,048	0,035	
16	2600	Kaninchen Nr. VI, 6 ccm	0,093	0,073	0,078	
80	2450	Kaninchen Nr. VII, 10 ccm	0,104	0,083	0,102	
51	1650	Kaninchen Nr. 807, 6 ccm	0,069	0,066	0,065	
66	2050	Kaninchen Nr. 119, 15 ccm	0,094	0,074	0,075	
70	2200	Kaninchen Nr. VIII, 2 ccm	0,105	0,114	0,107	
2	2550	Kaninchen Nr. 113, 5 ccm	0,085	0,090	0,101	

Aus der Tabelle IV ersieht man, daß es einmal zum Krampf (Kaninchen Nr. 2) kam, hier war der Darminhalt des Kaninchens Nr. III (Tabelle I) eingespritzt, aber dieser war bereits 2 Stunden nach Einbringen des Insulins entnommen. Sonst kam es nur noch einmal zu einer tiefen Senkung des Blutzuckers unter die Krampfgrenze, in den übrigen Fällen zeigte sich sonst keine oder nur eine noch gerade angedeutete Senkung. Dies bedeutet, daß nach 4 Stunden meist im Darm-

inhalt gar nichts, ausnahmsweise noch etwas von dem Insulin vorhanden ist, der bei weitem größte Teil also nicht mehr nachzuweisen ist.

Von Möglichkeiten zur Erklärung der Wirkungslosigkeit bzw. des Verschwindens des in den Darm gebrachten Insulins sehe ich folgende:

1. Das Insulin wird durch die Darmfermente zerstört;
2. es wird durch die Darmwand oder auch durch den Darminhalt irgendwie festgehalten, vielleicht adsorbiert; es kann dann nicht resorbiert werden weder aus dem Darm des ersten Tieres noch aus dem subkutanen Gewebe des zweiten Tieres, dem der Darminhalt eingespritzt wird.

Was die Wirkung der Verdauungsfermente auf Insulin betrifft, so hatte man von je daran gedacht, daß es durch Trypsin definitiv zerstört wird. Dies war ja auch der Gedanke der *Banting-Best-Collipsschen* Darstellung.

Wir fanden aber später in der Literatur auch einige Angaben, nach welchen Insulin, mit Trypsin zusammengebracht, nicht zerstört, sondern sofort inaktiviert (*Scott*¹, *Shonle* und *Waldo*², *Epstein* und *Rosenthal*³, *Weiss* und *Pogány*⁴) wird. Dann kann es aber noch durch verschiedene Maßnahmen wieder seine volle Wirksamkeit zurückerhalten. Wenn man die beiden Stoffe allerdings länger, und zwar bei 37° zusammen läßt, tritt allerdings nach einigen Autoren allmählich ein irreparabler Verlust an Wirksamkeit ein (nach *Scott* nach 12 Stunden, nach *Shonle* und *Waldo* nach 5½ Stunden). Letzteres, eine Zerstörung also, hatten ja auch, wie oben erwähnt, die ersten Untersucher (*Banting* und *Best*⁵, *Witzemann* und *Livshis*⁶) schon feststellen können. Über die Wirkung des Erepsins liegen Versuche von *F. Waldschmidt-Leitz*⁷ vor; danach soll dieses Ferment das Insulin nicht angreifen. Allerdings müssen wir bemerken, daß bei all diesen Versuchen — *Scott* und *Shonle* und *Waldo* ausgeschlossen — keine quantitative Auswertung des Insulins vorliegt, und es so leicht möglich ist, daß den Autoren auch eine wesentliche Verminderung des Insulins entgangen ist.

Im weiteren stellten wir *in-vitro*-Versuche an, um zu sehen, was mit Insulin geschieht, wenn es mit der Darmwand zusammengebracht wird.

Zu diesem Zwecke war unser Verfahren das folgende: Gesunde Kaninchen wurden durch Nackenschlag getötet, der Dünndarm in einem Abstand von ungefähr 20 cm vom Pylorus und 15 bis 20 cm vom Blinddarm herausgeschnitten und vom Mesenterium befreit. Er wurde dann mit physiologischer NaCl-Lösung gut ausgewaschen, in vier ziemlich gleiche Stücke von ungefähr 40 cm Länge (Gewicht 15 bis 20 g) geschnitten und jedes Stück

¹ Journ. of biol. Chem. **63**, 641, 1925.

² Ebendasselbst **66**, 467, 1925.

³ Amer. Journ. of Physiol. **70**, 225, 1924; **71**, 316, 1925.

⁴ Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **50**, 786, 1926.

⁵ Journ. Lab. a. clin. Med. **7**, 251, 1921/22.

⁶ Journ. of biol. Chem. **57**, 425, 1923.

⁷ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **59**, 2367, 1926.

an beiden Enden abgebunden. In zwei Darmstücken wurden je 80 (intern.) Einheiten Insulin, gelöst in 4 ccm n/100 HCl, eingespritzt, und die beiden anderen Darmstücke, in die 4 ccm n/100 HCl eingespritzt wurden, als Kontrolle benutzt. Die Darmteile wurden in Flaschen getan, deren jede 5 ccm 0,9%ige NaCl-Lösung enthielt. Die vier Flaschen wurden dann im Brutzimmer bei 37° C 3 Stunden lang im Schüttelapparat geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden die Darmstücke fein zerkleinert und mit der Außenflüssigkeit sowie mit dem Darminhalt vereinigt und als „Darmbrei“ bezeichnet. Schon hier sei bemerkt, daß sowohl Darminhalt wie Außenflüssigkeit eine annähernd neutrale Reaktion zeigten, nämlich in allen Versuchen lag sie in der Nähe des Umschlagpunktes von Lackmus.

Jeder Darmbrei wurde nun wie bei der Herstellung des Insulins aus Pankreas mit dem vierfachen Volumen 80%igen Alkohols, der 2% HCl enthielt, vermischt und über Nacht im Kühlraum stehengelassen. Am nächsten Tage wurde zentrifugiert, in der klaren Flüssigkeit mit absolutem Alkohol und Äther in der üblichen Weise ein Niederschlag erzeugt. Nach wieder ungefähr zwölfstündigem Stehen bei etwa 1° C wurde zentrifugiert, und der Niederschlag nach Trocknen im Vakuum in n/100 HCl gelöst. Das Präzipitat ging immer leicht in Lösung.

Diese Lösung wurde an Hungerkaninchen ausgewertet, so daß möglichst vier Tiere mit derselben Menge desselben Extrakts subkutan eingespritzt wurden. Einigemale wurden nur zwei Tiere aus Mangel an Material benutzt.

In der Tabelle V bedeutet C einen Versuch mit einem Darmteil aus einem Kaninchen (1010); I plus II und III plus IV sind Darmteile aus einem anderen Kaninchen (1011); bei diesem Versuch mit Kaninchen 1011 wurde der Dünndarm in acht statt in vier gleiche Teile (von etwa 8 bis 10 statt 15 bis 20 g) geschnitten und hiervon vier Teile (I bis IV) mit je 80 Einheiten Insulin gefüllt. Bei dem Verarbeiten auf Insulin mit Alkohol wurden jedoch jedesmal zwei solche Flascheninhalte vereinigt, daher die Bezeichnung I plus II und III plus IV. (Über die Ergebnisse der Extrakte aus den Kontrollteilen siehe später.)

Tabelle V.

Kaninchen subkutan eingespritzt mit Extrakten von mit Insulin gefüllten Darmteilen.

Nr.	Eingespritzter Extrakt	Blutzucker ‰			Bemerkungen	Einheiten Insulin wieder gefunden
		vor der Injektion	2 Std. nach der Injektion	4 Std. nach der Injektion		
12	$\frac{1}{8}$ vom Darmteil C mit 80 E. Insulin	0,99	0,30	—	In d. 3. Std. Krampf. Nach 4 g Dextrose subkut. Wiederherst. Ebenso	> 6 < 24
88	Ebenso	1,08	0,56	—		
264	$\frac{1}{24}$ von C	1,02	0,91	1,10		
44	Ebenso	1,05	0,97	1,00		etwa 3
67	$\frac{1}{3}$ vom Darmteil I + II mit 160 E. Ins.	0,82	0,32	0,09		
65	Ebenso	0,84	0,65	0,57		
31	$\frac{1}{5}$ vom Darmteil III + IV mit 160 E. Ins.	0,92	0,82	0,94		< 5
258	Ebenso	0,91	0,46	0,86		
67	"	0,99	0,40	0,99		
123	"	0,96	1,04	1,04		

Wie man aus der Tabelle V entnehmen kann, ist das zu dem Darm zugefügte Insulin fast gänzlich verschwunden, wahrscheinlich zerstört, denn von den hinzugefügten 80 Einheiten findet man noch kaum 10 % zurück.

Wie bereits erwähnt, war die Reaktion des Darminhalts immer in der Nähe des Umschlagpunktes des Lackmus (rotes Lackmuspapier wurde kaum blau); es könnte uns entgegengehalten werden, daß Insulin, bei dieser Reaktion bei 37° C geschüttelt, an und für sich zugrunde geht, ohne daß der Darm als solcher etwas damit zu tun hätte. Wir konnten uns jedoch überzeugen, daß dem nicht so ist.

10 internationale Einheiten Insulin wurden in n/100 HCl gelöst; daraufhin fügten wir tropfenweise so viel NaHCO₃ hinzu (das Insulin flockt dabei aus), bis die Reaktion mit Lackmus ganz schwach alkalisch war. Dieses Gemisch wurde nun, genau wie bei den Darmversuchen, 3 Stunden bei 37° C geschüttelt. Hiernach säuerten wir es mit einigen Tropfen n/10 HCl an, bis das ausgeflockte Insulin wieder in Lösung ging, und werteten die Flüssigkeit an vier Hungerkaninchen aus.

Es ergab sich nun, daß ein Zehntel der sauren Lösung eingespritzt, bei allen Tieren niedrigen Blutzucker (0,29, 0,35, 0,40, 0,33⁰/₁₀₀) und Krampf verursachte. Somit waren also alle 10 Einheiten unverändert zurückzugewinnen.

Da alle vier Tiere Krampf bekamen, wo sonst nach Einspritzen einer Einheit es wohl zu niedrigem Blutzucker, doch seltener zu Krampf kommt, gewinnt man den Eindruck, als wenn das mit NaHCO₃ behandelte Insulin sich verstärkt hätte. Dies würde übereinstimmen mit noch unveröffentlichten Versuchen dieses Laboratoriums (*E. Dingemanse*), nach welchen Insulin mit NaHCO₃ nicht nur ohne Verlust zu reinigen wäre, sondern dadurch in seiner Wirkung verstärkt würde.

Das Verschwinden des Insulins in unseren Versuchen ist also auf den Darm oder seine Sekrete und Bakterienflora zurückzuführen. Es wäre auch möglich, daß die organische Substanz der Darmwand, hauptsächlich das Eiweiß, das Insulin adsorbiert, so daß es nur deswegen bei dem Alkoholverfahren nicht zurückzugewinnen ist, also dieses Verfahren nur ungeeignet ist, Insulin unter diesen Umständen darzustellen. Darum gingen wir nach, was mit dem in n/100 HCl gelösten Insulin geschieht, wenn es für kurze Zeit mit Darmbrei zusammengebracht wird.

Hierzu wurde einem gesunden Kaninchen in der schon beschriebenen Weise der Dünndarm herausgenommen, in gleich lange Stücke geschnitten, dieselben fein zermahlen und dem Brei je 80 Einheiten Insulin, in 4 ccm n/100 HCl gelöst, hinzugefügt. Nachdem es in einem Mörser gut zerrieben war, wurde es in der bekannten Weise mit Alkohol verarbeitet. Das am Ende erhaltene Produkt wurde in n/100 HCl gelöst und am Hungerkaninchen ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI zusammengefaßt.

Tabelle VI.

Kaninchen, eingespritzt mit Extrakten aus Darmbrei, kurze Zeit mit Insulin zusammengebracht.

Nr.	Eingespritzter Extrakt	Blutzucker ‰			Bemerkungen	Einheiten Insulin wieder gefunden
		vor der Injektion	2 Std.	4 Std.		
			nach der Injektion			
70	$\frac{1}{80}$ vom Darm + 80 E. Insulin; A	1,21	0,63	0,90	In d. 3. Std. Krampf. Nach 4 g Dextrose subkutan Wiederherstellung Krampf	80
285	Ebenso	0,99	0,29	—	"	
26	"	0,84	0,31	—	"	
266	"	1,01	0,35	—	"	
277	$\frac{1}{80}$ vom Darm + 80 E. Insulin; B	0,96	0,29	—	Krampf	80
260	Ebenso	1,19	0,46	0,50	"	
129	"	1,02	0,33	—	Krampf, 4 g Dextrose subkutan	
253	"	1,18	0,51	—	Ebenso	

Tabelle VI zeigt, daß $\frac{1}{80}$ der Gesamtmenge eingespritzt, die Wirkung einer vollen Einheit ergibt, es sind also 80, das sind sämtliche zugefügten Einheiten Insulin, wiedergefunden. Daraus folgt also, daß Darmbrei Insulin weder zerstört noch festhält, wenn er damit nur kurze Zeit etwa 10 Minuten in Berührung gewesen.

Es bleibt nur die Auffassung übrig, daß die Zerstörung des Insulins mit der Tätigkeit der Darmzellen bzw. ihres Sekretes oder der Darmbakterien in Zusammenhang zu bringen ist. Am ehesten ist es wohl das Erepsin, an dessen Rolle man zu denken hat, obwohl man nach Angaben von *Felix* und *Waldschmidt-Leitz*¹ das Trypsin nicht ganz ausschließen darf.

Genannte Autoren geben nämlich in ihren Fermentstudien an, daß der Dünndarm nie, auch nicht nach sorgfältigstem Auswaschen, von dem einmal durch das Pankreas sezernierten Trypsin zu befreien ist; die Darmzellen häufen anscheinend das Trypsin in sich auf. Es galt nun, sowohl die im Darm noch vorhandenen Fermente wie auch die Darmzellen selber, abzutöten. Wir dachten dies durch NaF zu erreichen. Nach Literaturangaben lähmt eine 1%ige NaF-Lösung das Erepsin, und nach den bekannten Resorptionsversuchen von *Heidenhain* tötet NaF schon in Konzentrationen von 0,05% die Darmzellen.

Vor der Benutzung des Dünndarms zu dem Insulinversuch füllten wir ihn mit einer 1% NaF enthaltenden 0,9%igen NaCl-Lösung; er wurde dann in eine Lösung gleicher Zusammenstellung gelegt und blieb für 1 Stunde im Eisschrank.

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. 151, 3, 1926.

Danach wurde er mit 0,9%igem NaCl ab- und ausgespült, mit Insulin gefüllt und bei 37° geschüttelt, wie in den vorigen Versuchen.

Doch auch dieser Versuch fiel wie der erste (Tabelle V) aus, d. h. von dem zugefügten Insulin war nur ein kleiner Teil, ungefähr 5 Einheiten, d. h. noch nicht 10% zurückzufinden. Daraus zu schließen, daß das tote Material ohne Fermente zur Zerstörung bzw. Bindung von Insulin imstande ist, ist aber wohl doch nicht zwingend, weil möglicherweise unser Verfahren mit NaF nicht zur Tötung des Darmes und seiner Fermente und Bakterien genügt. In dieser Richtung müßten noch weitere Versuche vorgenommen werden.

Wie bereits erwähnt, benutzten wir bei den Darmversuchen stets Kontrolldarmstücke, d. h. Teile desselben Dünndarms von derselben Länge, wie zum Insulinversuch, nur wurden diese bloß mit 4 ccm n/100 HCl gefüllt, dann aber auch im Brutzimmer bei 37° geschüttelt. Nachher wurden sie genau in derselben Weise verarbeitet wie die Insulindarmteile. Es ergab sich hier nun der merkwürdige Befund, daß von fünf Kontrolldarmteilen, drei bei Kaninchen Hypoglykämie und Krämpfe verursachten. Als Beispiel seien zwei Fälle tabellarisch wiedergegeben.

Tabelle VII.

Kaninchen, eingespritzt mit Extrakt aus Kontrolldarmteilen.

Nr.	Eingespritzt Extrakt	Blutzucker ‰			Bemerkungen	Einheiten gefunden
		vor der Injektion	2 Std.	4 Std.		
			nach der Injektion			
31	$\frac{1}{48}$ von Kontroll-darm V + VI	0,88	0,23	—	Krampf. 4 g Dex-trose	} < 48
46	Ebenso	0,80	0,34	—	Ebenso	
73	"	1,14	0,32	—	"	
258	"	0,95	0,19	—	"	
23	$\frac{1}{6}$ von Kontroll-darm Va	1,00	0,30	—		} < 6 > 24
103	$\frac{1}{24}$ von Kontroll-darm Va	1,08	1,07	0,95		

Die Fälle, wo der Extrakt von Kontrolltieren keine Blutzuckererniedrigung gab, sind nicht wiedergegeben. Daß aber solche Senkungen wiederholt vorhanden, legt natürlich den Gedanken nahe, daß die Stoffe, denen diese Wirkung zuzuschreiben ist, vielleicht nur in bestimmten Darmteilen vorkommen. Ohne diese Frage hier endgültig entscheiden zu wollen, seien einige Versuche angeführt.

Drei gesunde Kaninchen (Versuch A, B und C), durch Nackenschlag getötet, jedem der Dünndarm herausgenommen, in vier ziemlich gleiche Stücke geschnitten und in der üblichen Weise mit je 4 ccm n 100 HCl gefüllt, bei 37° geschüttelt und nachher dem Alkoholverfahren unterworfen. Das Endprodukt wurde an je vier Hungerkaninchen geprüft.

Bei diesen Versuchen wurde darauf besonders geachtet, welchem Dünndarmteil je ein Darmstück zugehört; das Duodenum und ein Stück etwa 20 cm vor dem Blinddarm wurden nicht verarbeitet. Die Darmstücke wurden, vom oralen Ende angefangen gegen das aborale Ende zu, mit 1, 2, 3 und 4 bezeichnet.

Tabelle VIII.

Kaninchen, eingespritzt mit Darmextrakten.

Eingespritzt	Testkaninchen Nr.	Versuch A. Niedrigster Blutzucker $\frac{0}{100}$	Testkaninchen Nr.	Versuch B. Niedrigster Blutzucker $\frac{0}{100}$ binnen 4 Std.	Testkaninchen Nr.	Versuch C. Niedrigster Blutzucker $\frac{0}{100}$ binnen 4 Std.
$\frac{1}{5}$ von Darmteil 1	261 5 30 77	0,80 0,99 0,87 0,81	125 102 122 284	1,01 0,89 0,99 0,88	31 258 17 46	0,80 0,43 0,98 0,82
$\frac{1}{5}$ von Darmteil 2	118 25 50 251	0,93 0,99 0,90 0,76	41 277 148 101	0,76 0,92 0,96 0,77	65 67 93 73	0,97 0,90 1,10 0,94
$\frac{1}{5}$ von Darmteil 3	59 131 89 74	0,21 K. 0,17 K. 0,29 K. 0,16 K.	20 108 280 83	0,97 0,92 0,92 0,90	53 265 278 116	0,87 0,97 1,05 0,78
$\frac{1}{5}$ von Darmteil 4	71 128 37	0,82 0,97 0,87	24 35 279	1,22 1,18 1,11	123 92 45 79	0,97 1,08 1,03 0,90

K. = Krampf.

Von den 12 Stücken aus den drei Kaninchen war nur eins, und zwar Stück 3 (etwa Anfang des Iliums) eines Tieres, das zweifellos stärkeren Insulineffekt gab (Blutzuckersenkung und Krämpfe bei allen vier hiermit behandelten Tieren). Da ein Fünftel des Extraktes bereits diesen Effekt hatte, würden sicher mehr als 5 Einheiten (internationale) in diesem Stück vorhanden sein. Daß es sich hierbei um kein regelmäßiges Vorkommen handelt, zeigen die analogen Stücke aus den beiden anderen Kaninchen B und C, deren Extrakte keinen Einfluß hatten. Daß eins der Testkaninchen 258 mit dem Extrakt aus Darmteil 1 von Kaninchen C eine Senkung bis auf 0,43 zeigte (nach 4 Stunden; nach 2 Stunden hatte es 0,63) ist wohl ohne Bedeutung, da die drei anderen Testkaninchen von dem gleichen Extrakt unbeeinflusst blieben.

In der Literatur wurde des öfteren darauf hingewiesen, daß aus Duodenum und Magenschleimhaut eine insulinartige Substanz zu isolieren ist (*Ivy u. Fisher*¹); nach *Penau* und *Simonnet*² soll Sekretin,

¹ Amer. Journ. Physiol. 67, 445, 1924.² C. r. Acad. d. Sciences 178, 2208, 1924.

aus dem Duodenum hergestellt, bei Kaninchen Hypoglykämie und Krämpfe verursachen. Unsere Ergebnisse sind von diesen Versuchen insofern verschieden, daß wir einesteils gerade das Duodenum nie gebrauchten, andererseits nicht bloß die Darmmucosa, sondern die ganze Darmwand verwendeten.

Zusammenfassung.

1. Insulin (40 bis 80 internationale Einheiten) in n/100 HCl-Lösung bei Bauchfensterkaninchen direkt in den Dünndarm eingespritzt, hat keine blutzuckererniedrigende Wirkung, hingegen kommt es oft zur Hyperglykämie.

2. Kontrollversuche zeigten, daß die Hyperglykämie auf die zur Lösung des Insulins gebrauchte n/100 HCl zurückzuführen ist, da ähnliche Kontrollversuche mit 0,9 %igem NaCl den Blutzucker unbeeinflußt ließen.

3. Insulin in vitro bei 37° 3 Stunden mit Dünndarmbrei geschüttelt, wird zerstört.

4. Insulin, kurze Zeit mit Dünndarmbrei in Berührung, wird von demselben weder zerstört, noch festgehalten; es ist mit dem Alkoholverfahren quantitativ zurückzugewinnen.

5. Auch durch Darm, der mit NaF vergiftet ist, kommt Zerstörung des Insulins zustande.

6. Aus Teilen des Darmes ist gelegentlich eine Substanz zu isolieren, welche insulinartige Wirkung hat (Hypoglykämie und Krämpfe bei den Hungerkaninchen); bisher hat sich nicht ermitteln lassen, ob bestimmte Darmteile hierfür besonders prädestiniert sind.

Eine Modifikation des Barcroftschen Blutgasanalysenapparates und zugleich eines Mikrorespirometers.

Von
L. Drastich.

(Aus dem Physiologischen Institut der Masaryk-Universität in Brünn.)

(Eingegangen am 23. Juni 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Auf Grund meines Mikrorespirometers, das ich seit dem Jahre 1922 in mehreren Modifikationen konstruiert habe¹, stellte ich durch zweckmäßige Abänderungen einen Blutgasanalysenapparat her, der vor dem ursprünglichen *Barcroftschen* Blutgasmanometer den Vorteil hat, daß man keine Konstante zur Bestimmung des Blutgasvolumens braucht, sondern daß er direkt das Gasvolumen in Kubikmillimetern an der Skala abzulesen gestattet. Man kann weiter zur Analyse jede Menge des Blutes, die man gerade zur Verfügung hat, benutzen, denn es gibt außer einer gröberen, in $\frac{1}{100}$ ccm geteilten Skala noch eine andere, in Kubikmillimeter geteilte.

Manche Vorteile hat auch *Versars* Modifikation des *Barcroftschen* Apparats, der die *Hoffmann-Münzer-Neumannsche*² Pipette, die zur Bestimmung der Konstante dient, modifizierte und dauernd dem Apparat zufügte. Doch halte ich meine Modifikation für praktischer, besonders den Ersatz der auch bei *Barcroft* üblichen zwei Hähne durch einen besonderen Doppelschwanzhahn und durch die besonders zweckmäßige Form der Gefäße, für deren glückliche Lösung ich dem Herrn Doz. Dr. J. Petřík danke.

Im weiteren will ich den Apparat kurz beschreiben.

Das Prinzip ist dasselbe wie bei den meisten mikrorespiratorischen (*Thunberg*, *Winterstein*, *Krogh*) und Mikroblutgasanalysenapparaten (*Barcroft*), so daß sich das nähere Eingehen auf dasselbe erübrigen dürfte.

¹ Biol. Listy 10, 1; Zeitschr. f. vergl. Physiol. 2, 632.

² Journ. of Physiol. 47, 272; diese Zeitschr. 81, 319, 1917; 151, 246, 1924; *Pincussen*, Mikrotechnik. Leipzig, Thieme.

Treibt man aus dem Blute im Analysator (Abb. 1, *A*) ein Gas, z. B. Sauerstoff, durch Ferricyankalium aus und ist der Doppelschwanzhahn (Abb. 1 und 2, H_1) geschlossen (d. h. in der Lage II, Abb. 2), so bewegt sich der Index (Abb. 1, *I*) in einer Kapillare von etwa 0,6 mm Durchmesser in der Richtung des niedrigeren Druckes. Um denselben in die ursprüngliche Lage zu bringen, schraubt man die Quetschklemme (Q_1) ab, so daß das

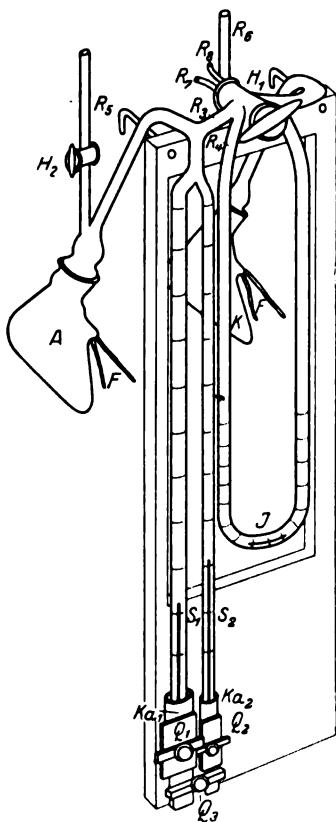


Abb. 1.

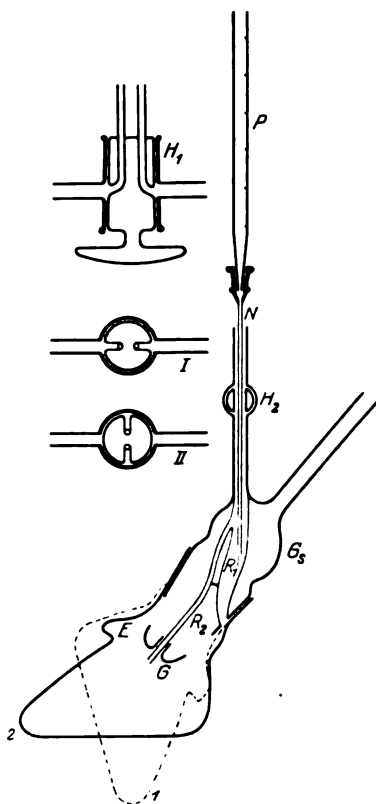


Abb. 2.

Quecksilber in der Skalenröhre (S_1) sinkt. Zum feineren Einstellen dient die Quetschklemme (Q_2), die das Quecksilber in einer in Kubikmillimeter geteilten Kapillare (S_2) bewegt.

Der Analysator *A* ist ein Gefäß von etwa 20 ccm Inhalt, das man an den Glasstößel (Abb. 2, G_s) mittels Lanolins dicht ansetzen kann. Seine Form ist so angepaßt, daß in der Lage 1 (gestrichelt gezeichnet, mit der Spitze nach unten) die Oberfläche der Flüssigkeiten möglichst klein ist. Dreht man aber das Gefäß an dem Glasstößel mit schief gerichteter Achse um 180° (Lage 2, ausgezogen gezeichnet), so haben die Flüssigkeiten umgekehrt die größten Oberflächen, so daß die Gase aus dem Blute rascher entweichen können. In dieser Lage fließt auch die blutgastreibende Lösung

(z. B. Weinsäure) aus dem Röhrchen (R_1) in das Analysengefäß ein. Freilich muß da eine Kommunikation mit der Gefäßluft durch das Röhrchen R_2 vorhanden sein, um den Abfluß zu ermöglichen. An dem genannten Röhrchen wird noch ein kleines Gefäß mittels eines Kautschukringes angebracht (G), das die andere blutgastreibende Lösung (Ferrieyankaliumlösung) enthält und durch starke Neigung des ganzen Apparats ausgeschüttet werden kann. Bei kleinen Blutmengen können einige Tropfen dieser Flüssigkeit in die Gefäßwandeinbuchtung (E), die sich beim Drehen des Gefäßes von selbst ausschüttet, gebracht werden.

Ganz ähnlich schaut der Kompensator K aus.

Der Doppelschwanzhahn ist leicht aus der Zeichnung in der Abb. 2, H_1 , begreiflich. Bei seiner horizontalen Lage (I) sind also beide Gefäße (Analysator und Kompensator) mit der äußeren Luft in Verbindung. Dreht man aber denselben in eine vertikale Lage (II), dann sind beide Gefäße von der äußeren Luft abgeschlossen und nur durch den leicht beweglichen Index (I in Abb. 1) voneinander getrennt, denn die Röhren R_3 und R_4 kommunizieren miteinander dicht an dem Hahn. (Dadurch wird das Einfüllen des Petroleumindex vom Innern des Hahnmantels aus sehr erleichtert.)

An der Röhre R_2 sind zwei kalibrierte Glasröhrchen angebracht. S_1 ist in $\frac{1}{100}$, S_2 in $\frac{1}{1000}$ ccm geteilt. Das Quecksilber in denselben wird durch breite Quetschklemmen (Q_1 und Q_2), die auf kurze Kautschuksäcke aus Kautschukschläuchen (Ka_1 , Ka_2) drücken, auf und ab bewegt.

Eine Blutgasanalyse wird nun folgendermaßen durchgeführt: In den Analysator (A) und in den Kompensator (K), die mit zwei Füßchen (F in Abb. 1) versehen sind und so auf den Tisch gestellt werden können, gibt man 2 ccm verdünnten Ammoniaks (4 ccm auf 1 Liter Wasser). Unter denselben schichtet man das zur Analyse bestimmte Blut, und zwar, wenn möglich, 1 ccm. In das Schälchen G (Abb. 2) der beiden Gefäße tropft man aus einer Pipette 0,2 ccm kalt gesättigter Ferrieyankaliumlösung. Darauf fettet man die Glasstöpsel mit Lanolin gut ein und setzt die beiden Gefäße in derselben Lage, wie sie auf dem Tische gestanden, darauf. Dann füllt man eine in 0,1 ccm geteilte Pipette (P), auf deren Spitze eine Injektionsnadel N gut eingeschliffen ist, mit 20%iger Weinsäurelösung. Die Nadelspitze wischt man mit Filterpapier ab und schiebt die Nadel durch die Hahnbohrung (H_2) bis in die Röhre R_1 vor, läßt dann in dieselbe 0,2 ccm abfließen und zieht sie wieder heraus.

Darauf stellt man die Gefäße in ein Wasserbad (bei gewöhnlicher Temperatur), in dem das Wasser ständig umgerührt wird. Nach einigen Minuten schließt man den Hahn H_1 (Lage II) und liest an den beiden Skalen die Skalenwertsummen „ x “ ab, wobei man auch die Indexlage notiert. Dann dreht man die Gefäße um etwa 150° , damit die Flüssigkeit eine größere Oberfläche hat, und unterstützt durch Schütteln die Hämolyse des Blutes (außerhalb des Wasserbades). Handelt es sich um Venenblut, so nimmt dasselbe Sauerstoff aus der Gefäßatmosphäre auf, und der Index verschiebt sich nach der Richtung des niedrigeren Druckes. Durch Hebung der Quecksilbersäule in einem der Skalenröhrchen bringt man den Index auf die ursprüngliche Stelle, und auf der Skala liest man bei derselben Indexlage den zweiten Skalenwert „ y “ ab. Durch Neigung des ganzen Apparats schüttet man die Ferrieyankaliumlösung in die Blutlösung ein, und der ausgetriebene Sauerstoff, der den Index jetzt in der anderen

Richtung verschiebt, wird durch das Zurückschaffen desselben mittels Senkung des Quecksilbers bestimmt (Ableseung „z“).

Jetzt dreht man endlich beide Gefäße (*A* und *K*) noch um 30° in derselben Richtung wie vorher, so daß die Weinsäurelösung in die Blutprobe, eventuell Ammoniak-Kontrolllösung, ausfließt. Das entstandene Kohlendioxyd wird wiederum in der geschilderten Weise bestimmt (Wert „u“). Es ist selbstverständlich, daß man vor allen Ableseungen den vollständigen Ablauf der Reaktionen und den Temperatenausgleich abwarten muß.

Die weitere Berechnung geschieht auf folgende Weise:

$x - y$ = Differenz des Sauerstoffgehalts im venösen und arteriellen (das ist beinahe gesättigtem) Blute.

$z - y$ = Sauerstoffgehalt im sauerstoffgesättigten Blute (arteriellen).

$z - x$ = Sauerstoffgehalt im untersuchten (venösen) Blute.

$u - z$ = Kohlensäuregehalt des Blutes.

Ist 1 ccm Blut zur Verfügung, so bedeutet jeder Teil auf der Skala S_1 1 %, auf der Skala S_2 $1/10$ %. Anderenfalls ist es nötig, die gefundenen Werte auf Volumenprocente zu berechnen.

Beispiel. Einem Kaninchen wurden aus der Ohrvene mit einer Tuberkulinspritze 0,8 ccm Blut entnommen und dasselbe gleich in den Analysator unter verdünntes Ammoniak (2 ccm) geschichtet. Der Komparator enthielt nur 2 ccm verdünnten Ammoniaks. Nach eingetretenem Gleichgewicht in dem Wasserbad bei geschlossenem Hahn H_1 (Lage II) wurde an der Skala S_1 10, an S_2 40 abgelesen. Das rechte Ende des Petroleum-index stand auf 3. Nun wurde der ganze Apparat mit der linken Hand aus dem Wasser genommen, und mit der rechten Hand wurden beide Gefäße gedreht, und zwar so weit, daß die Weinsäure noch nicht herauslief. (Dabei muß man achtgeben, daß die Wärme der Finger nicht den Index heraustreibt. Faßt man das andere Gefäß, so geht der Index wieder zurück.) Dann wurde so lange geschüttelt, bis sich der Index nicht mehr rührte. Durch die Quetschklemme Q_1 bringt man dabei den aufsteigenden Index immer wieder zurück. Nach 9 Minuten erzielte man das Gleichgewicht. Nachdem der Index genau auf 3 eingestellt wurde, konnte man an der Skala S_1 8, an S_2 29 ablesen. Um die Sauerstoffmenge im sauerstoffgesättigten Blute zu bestimmen, nahm man den Apparat wieder aus dem Wasser heraus und neigte ihn so tief, daß die Ferrieyankaliumlösung in das hämolysierte Blut ausfloß und schüttelte es dann so lange unter Regulierung des Index mittels Quetschklemmen Q_1 und Q_2 , bis wieder seine ursprüngliche Lage (3 des rechten Endes — selbstverständlich im Wasserbad) erreicht wurde. Dies war der Fall beim 20. Teil auf Skala S_1 und 27. auf S_2 (nach 13 Minuten). Ähnlich wurde nach weiterem Umdrehen der Gefäße (so daß die Weinsäurelösung ausfloß) und tüchtigem Schütteln das Gleichgewicht der Gasdrucke in beiden Gefäßen bei 60 auf S_1 und 31 auf S_2 gefunden.

Die Resultate sind in der beigefügten Tabelle übersichtlich zusammengestellt.

Will man die Blutanalyse unter gewisser Sauerstoff- oder Kohlenstoffsäurespannung durchführen (z. B. bei Bestimmung der Alkalireserve), so kann man die betreffende Gasmischung in die Gefäße *A* und *K* durch die Röhren R_5 und R_6 einführen. Zur Kontrolle, wieviel Gas durch die

Blutgasanalyse: 0,8 ccm Blut aus der Ohrvene eines Kaninchens.

Ablesung	Skala		Skalen- summe	Tempe- ratur ° C	Nach 24 Stunden			
					Skala		Skalen- summe	Tempe- ratur ° C
	S ₁ cmm	S ₂ cmm			S ₁ cmm	S ₂ cmm		
Ablesung nach Unter- schichtung d. Blutes unt. Ammoniak (x)	10 ₀	40	140	20	10 ₀	26,7	126,7	20
Blut nach Hämolyse und Sättigung mit O ₂ (y)	8 ₀	29	109	20	8 ₀	13,6	93,6	20
Nach Austreiben von O ₂ durch Ferri- cyankalium (z) . .	20 ₀	27	227	20	20 ₀	12,2	212,2	20
Nach Austreiben von CO ₂ durch Wein- säure (u)	60 ₀	31	631	20	64 ₀	8,5	648,5	20

Berechnung der Werte der vorigen Tabelle.

Gasgehalt	Auf 0,8 ccm Blut	Auf 1 ccm Blut	Vol. %	Nach 24 Stunden		
				Auf 0,8 ccm Blut	Auf 1 ccm Blut	Vol. %
$x - y^*$	31	38	3,8	31,1	41	4,1
$z - y$	118	148	14,8	118,6	148	14,8
$z - x$	87	109	10,9	85,5	107	10,7
$u - z$	404	505	50,5	436,3	545	54,5

* Erklärung dieser Bezeichnung siehe auf S. 38.

einzelnen Gefäße durchgegangen ist, kann man es mittels Kautschuk-
schläuchen von den Röhren R_7 , R_8 , aus welchen es entweicht, unter Wasser
in ein Eudiometer führen.

Der ganze Apparat ist in einem kleinen Kästchen (10 × 14 × 24 cm)
montiert. Es sind daselbst auch alle nötigen Lösungen und andere Hilfs-
mittel untergebracht, um ihn auf Expeditionen leicht mitnehmen zu
können.

Benutzt man nur die in Kubikmillimeter geteilte Skala, so kann
der Apparat als Mikrorespirometer benutzt werden.

Der komplette Apparat wird vom Institutsmechaniker *J. Moravec*,
Brünn, Údolní 73, oder von der Firma Franz Hugershoff, Leipzig, geliefert.

Besteht ein ursächlicher Zusammenhang zwischen tonischer Muskelkontraktion und Milchsäurebildung?

Von

S. G. Zondek und F. Matakas.

(Aus der II. medizinischen Universitätsklinik der Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 27. Juni 1927.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

Über die Bedeutung der Milchsäure für den Muskel und seine Funktion ist in den letzten Jahren von physiologischer Seite viel gearbeitet worden.

Fletcher und *Hopkins* stellten die Theorie auf, daß die Milchsäure die Ursache der Muskelzuckung sei. Diese Auffassung, die von manchen Autoren angenommen, von anderen aber stets bezweifelt wurde, kann aus den verschiedensten Gründen nicht mehr aufrecht erhalten werden. Unter den experimentellen Untersuchungen, die gegen die genannte Auffassung sprechen, sei vor allem auf neuere Untersuchungen *Embdens*¹ und seiner Schüler hingewiesen, die zeigen konnten, daß die Milchsäurebildung den Vorgang der Muskelzuckung noch wesentlich überdauert, d. h. in die Erschlaffungsphase fällt und daher nicht die Ursache der Muskelzuckung sein kann.

Nicht weniger umstritten ist die Bedeutung der Milchsäure für den Vorgang der *tonischen* Muskelfunktion. Der Begriff der tonischen Muskelkontraktion ist zurzeit noch nicht einheitlich definiert; doch dürften zweckmäßigerweise als tonisch alle diejenigen Muskelkontraktionen bzw. Muskelkontrakturen bezeichnet werden, die nicht direkt mit der animalischen Funktion des Muskels (Zuckung, tetanische Kontraktion usw.) zusammenhängen. Die tonischen Muskelkontraktionen setzen immer langsam ein und halten lange an. Die tonische Kontraktion bzw. Kontraktur ist als vegetative Funktion aufzufassen und muß demgemäß wie alle vegetativen Funktionen im menschlichen Organismus entsprechend der Auffassung von *F. Kraus* und *S. G. Zondek*² durch die Regulatoren im vegetativen System (Nerv, Gift, Elektrolyt) ausgelöst werden können. Dies ist auch tatsächlich

¹ *Embdens*, Klin. Wochenschr. 1927, Nr. 14, S. 628; *Embdens*, *H. Hirsch-Kauffmann*, *E. Lenhartz* und *H. Deuticke*, Zeitschr. f. phys. Chem. 151, 209, 1926.

² *F. Kraus* und *S. G. Zondek*, Klin. Wochenschr. 36, 1773, 1922; *S. G. Zondek*, Die Elektrolyte, S. 128. Berlin, Verlag Julius Springer, 1927.

der Fall; denn wie die bereits vorliegenden Untersuchungen verschiedener Autoren (*Bethe*¹, *v. Fürth*², *Meyerhof*³, *Riesser*⁴ und seiner Schüler, *Matsuoka*⁵ u. a.) ergeben haben, lassen sich tonische Kontraktionen durch die verschiedensten Gifte (Chinin, Coffein, Chloroform, Veratrin usw.), durch Elektrolyte (KCl, K₂SO₄, HCl, NaOH, NH₄OH u. a.) und durch die mit Vaguswirkung ausgestatteten Stoffe (Acetylcholin) hervorrufen. Die Tatsache, daß die genannten Substanzen am Muskel den gleichen Effekt hervorrufen, entspricht an sich durchaus der Auffassung *S. G. Zondeks*⁶ von der Gleichförmigkeit der Nerv-, Gift- und Elektrolytwirkung. Um so auffälliger erwies sich bei der Durchsicht der Literatur, daß die Grundlagen der verschiedenen Kontrakturen ganz verschieden sein sollten. So wird z. B. von *Riesser*⁷, der in einem Übersichtsreferat zur Frage der Muskelkontraktur Stellung nimmt, ausgeführt, daß eine Gruppe der kontrakturerzeugenden Substanzen (Säuren, Basen, Narkotica) direkt, eine zweite dagegen (Chinin, Coffein) indirekt auf die Muskelplasmasubstanz wirke. In letzterem Falle soll die entstehende Milchsäure die unmittelbare Ursache der Kontraktur darstellen. Kontrakturenformen letzterer Art werden von *Riesser* und *Neuschloss*⁸ als physiologische Säurekontrakturen bezeichnet. Schließlich nimmt *Riesser* noch eine dritte Kontrakturenform an, die als „Erregungskontraktur“ bezeichnet wird. Bei dieser sollen die in Frage kommenden Substanzen (Kalisalze, Acetylcholin u. a.) durch Erregung der neuromuskulären Zwischensubstanz *Langley's* ihre Wirkung zur Entfaltung bringen. *Meyerhof*⁹ macht zwischen den einzelnen Kontrakturenformen überhaupt keinen Unterschied, sondern behauptet, daß alle mit Ausnahme der Acetylcholinkontraktur sekundär durch Milchsäurebildung hervorgerufen werden. Einen entgegengesetzten Standpunkt vertritt *Bethe*¹⁰ und seine Schule; wohl glaubt er, daß bei der physiologischen tonischen Kontraktion eine Substanz entstehe (Verkürzungssubstanz), die die Kontraktion auslöse, identifiziert aber diese Substanz nicht mit der Milch-

¹ *Bethe*, Pflügers Arch. 190, 491, 1923; *Bethe*, *Fränkel* und *Wilmers*, ebendasselbst 194, 45, 1922.

² Zitiert nach *Riesser*.

³ *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. 182, 230, 1920; 205, 415, 1924; 191, 138, 1921; Klin. Wochenschr., Jahrg. 3, Nr. 10, 1924, S. 392.

⁴ *Riesser* und *Neuschloss*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 92, 254, 1922; Zeitschr. f. physiol. Chem. 180, 176, 1923; *Riesser* und *Steinhausen*, Pflügers Arch. 197, 288, 1922; *Riesser* und *Richter*, ebendasselbst 207, 287, 1925; *Riesser* und *Heianzan*, ebendasselbst 207, 302, 1925.

⁵ *Matsuoka*, ebendasselbst 204, 51, 1924.

⁶ *S. G. Zondek*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 17 und 19; „Die Elektrolyte“, S. 120. Berlin, Julius Springer, 1927.

⁷ *Riesser*, Handb. d. normal. u. pathol. Physiol. (*Bethe*, *v. Bergmann*, *Embsen*, *Ellinger*) 8, 1. Hälfte, 1. Teil, S. 218; *Riesser* und *Neuschloss*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 93, 163, 1922; 92 und 94.

⁸ I. c. und Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. (*Bethe*, *v. Bergmann*, *Embsen*, *Ellinger*) 8, 1. Hälfte, 1. Teil, S. 236.

⁹ I. c.

¹⁰ *Bethe*, Pflügers Arch. 190, 491, 1923; *Bethe*, *Fränkel* und *Wilmers*, ebendasselbst 194, 45, 1922; *Wilmers*, ebendasselbst 178, 193, 1920; *Schott*, ebendasselbst 194, 271, 1922; *Ohno*, ebendasselbst 197, 362, 1922; *Saito*, ebendasselbst 198, 191, 1923; *Hin*, ebendasselbst 202, 144, 1924.

säure. Von den Stoffen, die im Experiment eine Verkürzung hervorrufen, nimmt er an, daß sie selbst eine Verkürzungssubstanz darstellen und ihre Wirkung nicht an die Milchsäurebildung gebunden ist. Zu diesen Ergebnissen kam *Bethe* lediglich auf Grund indirekter Überlegungen. Direkte Versuche über Milchsäurebildung bei den verschiedenen Kontrakturformen sind von ihm nicht ausgeführt worden.

Diese kurzen Literaturangaben zeigen ganz deutlich, daß von einer einheitlichen Auffassung über das Zustandekommen und das Wesen des tonischen Kontrakturvorganges beim Muskel keine Rede sein kann. Da bei der Mehrzahl der vorliegenden Untersuchungen die Frage, ob die verschiedenen Kontrakturformen durch Milchsäurebildung hervorgerufen werden oder nicht, in den Vordergrund gestellt wurde, schien es uns angebracht, die tonische Kontraktur gerade vom Standpunkt der Milchsäurebildung aus einer genaueren Analyse zu unterwerfen; dies hielten wir um so mehr für notwendig, als sich immer deutlicher zeigt, daß die Milchsäure auch beim Zuckungsvorgang des Muskels nicht mehr *die* zentrale Bedeutung für sich beanspruchen darf, die man ihr lange Zeit zuzusprechen geneigt war.

Bei unseren Untersuchungen haben wir alle bisherigen Einteilungen vollkommen außer acht gelassen und unbefangen zu prüfen versucht, ob die einzelnen kontrakturerzeugenden Substanzen zu einer Milchsäurebildung führen, und inwieweit diese gebildete Milchsäure die Ursache der tonischen Kontraktur sein kann. Zur Kontrakturerzeugung wurden Substanzen angewandt, die nach den bisherigen Anschauungen Vertreter der verschiedensten Kontrakturformen darstellen, so Kalisalze, Chinin, Ammoniak, Chloroform, Acetylcholin. Bei der Prüfung der genannten Substanzen hat sich herausgestellt, daß alle bis auf das Acetylcholin bei der Einwirkung auf den isolierten quergestreiften Froschmuskel (*Gastrocnemius*) eine Milchsäurebildung hervorrufen, *daß aber die gebildete Milchsäure keineswegs in einem ursächlichen Zusammenhang mit dem tonischen Kontraktionsvorgang des Muskels stehen kann. Die gebildete Milchsäure kann unmöglich das Einsetzen der Muskelkontraktur bedingen; die Milchsäurebildung setzt nämlich in allen Fällen, wenn überhaupt, erst nach Eintritt der Kontraktur ein.*

Der Hauptfehler der bisher von den verschiedenen Autoren ausgeführten Untersuchungen ist unserer Ansicht nach folgender: Es wurde bei der Prüfung der verschiedenen Substanzen nur darauf geachtet, ob eine kontrakturerzeugende Substanz milchsäurebildend wirkt oder nicht; der zeitliche Ablauf der Milchsäurebildung und der Kontraktur wurde jedoch ganz außer acht gelassen. Ein weiterer Mangel der bisherigen Untersuchungen liegt unseres Erachtens darin, daß die einzelnen Autoren meist nur mit einer einzelnen, sie besonders interessierenden, kontrakturerzeugenden Substanz arbeiteten und deren Wirkung mit allen möglichen Methoden von verschiedenen Gesichts-

punkten aus untersuchten. So haben die verschiedenen Untersuchungen zu Ergebnissen geführt, die häufig nicht einmal miteinander verglichen werden können. Vielfach wurden bei Durchführung der Untersuchungen auch Feststellungen gemacht, die für die Erklärung des ursächlichen Zusammenhanges zwischen Muskelkontraktur und Milchsäurebildung entweder belanglos oder nur von untergeordneter Bedeutung waren; hingegen wurden die in Frage kommenden direkten Beweise nicht herangezogen. Die Muskelkontraktur als solche ist vom Gesichtspunkt der Milchsäurebildung aus in einheitlicher Weise bisher nie untersucht worden.

Unsere *Versuchsanordnung* war folgende:

Drei bis vier Frösche wurden für eine halbe bis eine Stunde in Eis gebracht und dann unter Vermeidung von Streckkrämpfen getötet und schonend abgehäutet. In zwei Gefäße, die je 10 bis 20 ccm durch Aufkochen luftfrei gemachte Ringerlösung enthielten, die mit Paraffin überschichtet und abgekühlt war, wurden die auf einer Eisplatte vorsichtig präparierten Gastrocnemii gebracht, und zwar so, daß in dem einen Gefäß die Gastrocnemii der rechten, in dem anderen die der linken Seite sich befanden. In diesen Gefäßen verblieben die Muskeln $\frac{1}{2}$ bis $1\frac{1}{2}$ Stunden. Sodann wurde dem einen Gefäß die kontrakturerzeugende Substanz zugesetzt. In manchen Fällen (wenn wir mit isotonischen oder unverdünnten Lösungen der kontrakturerzeugenden Substanzen arbeiteten) wurden die Muskeln aus den genannten Gefäßen in andere, die kontrakturerzeugende Substanz enthaltende Gefäße übergeführt. Nach einer bestimmten Zeit wurde der Versuch abgebrochen und der Milchsäuregehalt der Muskeln und der umgebenden Flüssigkeit bestimmt. Die Milchsäurebestimmung führten wir nach der von Meyerhof¹ angegebenen *Routine-Methode* aus. An Fröschen benutzten wir zuerst für jeden einzelnen Versuch wahllos *Rana esculenta* und *temporaria*. Späterhin benutzten wir lediglich *Rana temporaria*, weil sie für die Versuche geeigneter waren. (Ihre Reaktion gegenüber den kontrakturerzeugenden Substanzen erwies sich als eine konstantere.) Der weit größere Teil unserer Versuche ist mit *Rana temporaria* ausgeführt.

Methodik der Milchsäurebestimmung.

Die Muskeln wurden in 10 ccm eiskühler, 2%iger Salzsäure mit dem Pistill zerdrückt. Danach wurde die gleiche Menge Sublimat, ferner die Ringerlösung, in der sich die Muskeln während des Versuchs befanden, hinzugefügt, so daß die gesamte Flüssigkeitsmenge am Schluß des Versuchs 40 ccm betrug. Nach mindestens 15stündigem Stehen im Eisschrank wurde die Flüssigkeit filtriert, mit Schwefelwasserstoff (H_2S) so lange beschickt, bis sie wasserklar war, al-dann von neuem filtriert und 30 Minuten durchlüftet. Zur weiteren Untersuchung wurden 30 ccm entnommen und mit konzentrierter Natronlauge neutral bzw. schwach alkalisch gemacht. Hierzu wurden 10 ccm 10%igen $Ca(OH)_2$ und 5 ccm 10%igen $CuSO_4$ zugesetzt. Während einer halben Stunde wurde wiederholt geschüttelt, so daß die Färbung von Grünlich nach Blau umschlug. Danach

¹ O. Meyerhof, Pflügers Arch. 204, 295, 1924.

wurde filtriert und dem wasserklaren, farblosen Filtrat 30 ccm entnommen. Diese Flüssigkeitsmenge wurde im Kjeldahlkolben mit einigen Tropfen 10%iger Schwefelsäure neutralisiert oder schwach sauer gemacht und erhielt dann noch so viel 10%iger Schwefelsäure zugesetzt, daß die Schwefelsäurekonzentration 0,3 bis 0,4% betrug. Es kam also immer die Hälfte der ursprünglichen Flüssigkeit zur Destillation, so daß wir die gewonnenen Zahlen jedesmal mit 2 multiplizieren mußten. Nach Zusatz einiger Siedesteine wurde die Destillation mit $n/1000$ Kaliumpermanganat vorgenommen, wobei der frei werdende Aldehyd in einer sich in Eis befindlichen, eine bestimmte Menge von Bisulfit enthaltenden Vorlage aufgefangen wurde. Nach Beendigung der Destillation, d. h. 10 bis 15 Minuten nachdem das Destillat eine braunrote Farbe angenommen hatte, wurde das sich in der Vorlage frei befindliche Bisulfit mit einer Mikrobürette gegen eine $n/200$ Jodlösung titriert. Es wurde dabei beachtet, daß die Flüssigkeitsmenge, in der sich der zur Titration gelangende Aldehyd befand, stets gleich groß war. Bei der Herstellung vom Bisulfit wurde für große Sauberkeit Sorge getragen. Erst wurde eine $n/5$ Lösung zubereitet und sorgfältig im Eisschrank aufbewahrt; kurz vor Beginn der Destillation wurde eine $n/100$ Lösung hergestellt und davon ein Teil (5 ccm) in die Vorlage gebracht. Wenn ein merkliches Nachlassen des Titors auftrat, wurde die Bisulfitlösung erneuert. Gewöhnlich mußte dies schon nach wenigen Tagen erfolgen. Die Jod- und Permanganatlösungen wurden ebenfalls sorgfältig aufbewahrt, und erst kurz vor Beginn der Destillation bzw. der Titration wurden die verdünnten Lösungen zubereitet. Es sei auch darauf hingewiesen, daß der Muskel, in Salzsäure gebracht, *sofort* mit dem Pistill zerdrückt werden muß, da sonst durch die gleich auftretende Kontraktur eine Milchsäureproduktion einsetzt und dadurch die Milchsäurewerte sich erheblich verschieben können. Die zur Kontrolle unserer Methodik an Zinklactatlösungen ausgeführten Milchsäurebestimmungen ergaben, daß wir mit einem Fehler von höchstens 10% arbeiteten.

Versuche.

Vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen wurden Versuche angestellt, die zum Ziele hatten, den physiologischen Milchsäureanfangsgehalt der Muskeln bzw. die Milchsäureproduktion in der Ruhe und Anaerobiose in der Zeiteinheit zu bestimmen. Die Werte, die wir erhielten, stimmten im allgemeinen, wie aus Tabelle I hervorgeht, mit den von *Meyerhof*¹ angegebenen gut überein. Wir fanden als Anfangsgehalt Milchsäurewerte von etwa 0,26 bis 0,59 mg pro Gramm Muskelgewicht, d. h. also 0,026 bis 0,059%, für die Milchsäureproduktion in der Ruhe und Anaerobiose pro Stunde Werte von 0,06 bis 0,27 mg pro Gramm Muskelgewicht, d. h. also 0,006 bis 0,027%. Wurden die Muskeln beider Seiten unter gleichen Bedingungen gehalten, so fanden sich — wie ebenfalls aus Tabelle I (Versuche 7 und 8) hervorgeht — keine nachweisbaren Unterschiede zwischen dem Milchsäuregehalt der rechten und linken Seite.

Die Einwirkungsdauer der kontrakturerzeugenden Substanzen auf den Muskel erfolgte für relativ kurze bzw. längere Zeit. Bei den kurzdauernden

¹ *O. Meyerhof*, Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. (*Bethe, v. Bergmann, Embden, Ellinger*) 8, 1. Hälfte, 1. Teil, S. 485; *Pflügers Arch.* 188, 114, 1921.

Tabelle I.

Nr.	Datum	Zahl und Art der Frösche	Muskel- gewicht	Aufenthalt im Ringer	Gesamte Milch- säure	Milchsäure- Anfangsgehalt		Milchsäure- bildung in 1 Stunde
						pro g Muskel- gewicht	(%)	
	1926		g	Stunden	mg	mg		%
1	3. VII.	3 Escul.	r. 3,33	0	1,00	0,3	0,03	—
		3 "	l. 3,30	1	1,50	—	—	0,015
2	30. VI.	3 "	r. 2,91	0	0,79	0,27	0,027	—
		3 "	l. 2,90	1 $\frac{1}{2}$	1,98	—	—	0,027
3	29. VI.	3 "	r. 3,00	0	1,26	0,42	0,042	—
		3 "	l. 3,05	2	1,62	—	—	0,006
4	23. VI.	3 "	r. 2,90	0	1,78	0,59	0,059	—
		3 "	l. 3,00	3	2,68	—	—	0,01
5	1. VII.	3 "	r. 2,46	0	1,08	0,44	0,044	—
		3 "	l. 2,40	4	2,38	—	—	0,014
6	3. VII.	3 "	r. 3,00	0	0,77	0,26	0,026	—
		3 "	l. 2,95	5	1,89	—	—	0,007
7	5. VII.	3 "	r. 2,95	1	3,02	—	—	—
		3 "	l. 2,92	1	2,88	—	—	—
8	6. VII.	3 "	r. 2,58	1	1,01	—	—	—
		3 "	l. 2,59	1	1,01	—	—	—

Versuchen wurden die Muskeln nur so lange der Einwirkung der kontraktur-erzeugenden Substanzen ausgesetzt, bis die Kontraktur sicherlich eingesetzt haben mußte, in vielen Fällen sogar der Höhepunkt der Wirkung überschritten war. Wie aus den Abb. 1 bis 4 hervorgeht, tritt die Kontrakturwirkung bei den von uns angewandten Substanzen in der betreffenden Konzentration sofort nach ihrem Zusatz ein; Beim KCl und Chloroform ist der Höhepunkt der Wirkung nach 2 bis 10 Sekunden erreicht. Wir haben bei unseren kurz dauernden Versuchen mit diesen Substanzen eine Einwirkungsdauer von mindestens 15 Sekunden, oft sogar von 1 Minute gewählt,



Abb. 1.

Ri = Ringer. J. R. = Induktionsreize.

um den Eintritt der Wirkung sicher erfaßt zu haben. Beim Ammoniak und Chinin tritt die Kontraktur (s. Abb. 2 und 4) wesentlich langsamer ein; dementsprechend haben wir auch bei den Milchsäureversuchen die Einwirkungsdauer erhöht. Trotz Überschreitung der zum Einsetzen der Kontraktur notwendigen Zeit haben wir keine Zunahme der Milchsäurebildung gegenüber den Kontrollmuskeln nachweisen können. Dies war bei allen von uns angewandten Substanzen (Kalisalze, Chinin, Chloroform, Ammoniak, Acetylcholin) der Fall (s. Tabellen II bis V). Die in einigen Versuchen nachweisbaren kleinen Differenzen von 0,1 bis 0,2 mg liegen innerhalb der Fehlergrenzen der Methodik.



Abb. 2.

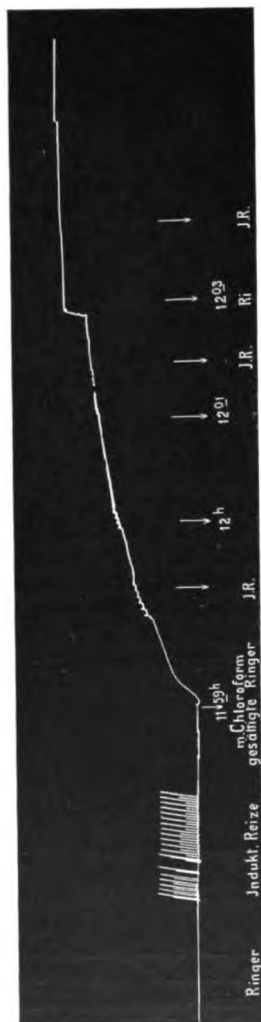


Abb. 3.



Abb. 4.

Ri = Ringer. J.R. = Induktionsreize.

Tabelle II. Kurzdauernde Versuche mit KCl.

Nr.	Datum 1926	Zahl und Art der Frösche	Muskelgewicht g	Erst	Danach	Gesamte Milchsäure mg
				Aufenthalt in Ringer Min.	Aufenthalt in Ringer + 1 % KCl Sek.	
1	7. VIII.	3 Temp.	r. 2,40	30	15	1,75
		3 "	l. 2,45 (Kontrollmuskel)	30	—	1,80
2	11. VIII.	3 "	r. 2,35	60	15	1,80
		3 "	l. 2,37 "	60	—	1,95
3	11. VIII.	3 "	r. 2,30	60	15	1,76
		3 "	l. 2,31 "	60	—	1,69
4	17. VII.	3 Escul.	r. 2,38	30	30	1,26
		3 "	l. 2,35 "	30	—	1,26
5	31. VII.	3 Temp.	r. 2,13	30	30	1,22
		3 "	l. 2,15 "	30	—	0,98
6	13. VIII.	3 "	r. 2,20	45	30	1,33
		3 "	l. 2,19 "	45	—	1,08
7	19. VII.	3 "	r. 2,41	30	45	2,23
		3 "	l. 2,40 "	30	—	2,04
8	10. VIII.	3 "	r. 2,53	30	45	1,53
		3 "	l. 2,55 "	30	—	1,28
9	22. VII.	3 "	r. 2,55	60	50	1,44
		3 "	l. 2,57 "	60	—	1,03

Eine Zunahme der Milchsäurebildung erfolgt also erst nach einer mehr als 30 Sekunden währenden Einwirkung der 1%igen KCl-Ringerlösung. Der Höhepunkt der Kontrakturwirkung ist dagegen bereits spätestens nach 10 Sekunden erreicht.

Tabelle III. Kurzdauernde Versuche mit Chinin.

Nr.	Datum 1926	Zahl und Art der Frösche	Muskelgewicht g	Erst	Danach	Gesamte Milchsäure mg
				Aufenthalt in Ringer Min.	Aufenthalt in Ringer + 0,1 % Chin. hydr. Min.	
1	10. IX.	3 Tem.	r. 2,10	60	3	0,85
		3 "	l. 2,09 (Kontrollmuskel)	60	—	0,99
2	27. X.	3 "	r. 2,30	60	4	1,47
		3 "	l. 2,36 "	60	—	1,49
3	6. IX.	2 "	r. 2,08	45	+ 0,5 % Chin. hydr. 2	1,75
		2 "	l. 2,06 "	45	—	1,91

Tabelle IV.

Kurzdauernde Versuche mit Ammoniak.

Nr.	Datum 1926	Zahl und Art der Frösche	Muskelgewicht g	Erst Aufenthalt in Ringer Min.	Danach Aufenthalt in Ringer + 0,2 % NH ₄ OH Min.	Gesamte Milchsäure mg
1	12. XI.	3 Temp.	r. 2,06	60	2	1,38
		3 "	l. 2,10 (Kontrollmuskel)	60	—	1,38
2	18. X.	3 "	r. 1,85	60	+ 0,3 % NH ₄ OH 2	1,83
		3 "	l. 1,90 "	60	—	1,57

Tabelle V.

Kurzdauernde Versuche mit Chloroform.

Nr.	Datum 1926	Zahl und Art der Frösche	Muskelgewicht g	Erst Aufenthalt in Ringer Min.	Danach Aufenthalt in reinem Chloroform Sek.	Gesamte Milchsäure mg
1	30. X.	3 Temp.	r. —	0	15	0,92
		3 "	l. — (Kontrollmuskel)	0	—	0,72
2	8. XI.	3 "	r. 2,38	60	15	1,29
		3 "	l. 2,40 "	60	—	1,25

Das Ergebnis der bisher wiedergegebenen Versuche können wir folgendermaßen zusammenfassen: *Die Auslösung der Tonuszunahme des Muskels bzw. der tonischen Kontraktion ist nicht durch Milchsäurebildung bedingt. Die Muskelkontraktur setzt zu einer Zeit ein, als noch keine Vermehrung der Milchsäurebildung nachweisbar ist.* — Um den scheinbaren Widerspruch, der zwischen den Ergebnissen unserer Versuche und denjenigen anderer Autoren besteht, aufzuklären, haben wir unsere Versuche nach der Richtung ergänzt, daß wir die Einwirkungsdauer der kontrakturerzeugenden Substanzen wesentlich verlängert haben. Für diese langdauernden Versuche wählten wir eine Einwirkungszeit von etwa 3 bis 30 Minuten. Das Ergebnis dieser Versuche war, wie aus den folgenden Tabellen (Tabellen VI bis X) hervorgeht, folgendes: *Mit Ausnahme des Acetylcholins rufen alle von uns benutzten Substanzen eine mehr oder minder starke Milchsäurebildung hervor.* Letztere ist am stärksten bei Chinin und Chloroform, geringer bei Ammoniak und Kalium. Da die kurzdauernden Versuche uns gelehrt haben, daß das Einsetzen der tonischen Muskelkontraktur ohne erhöhte Milchsäurebildung vor sich geht, *mußten wir aus den langdauernden*

Versuchen die Folgerung ziehen, daß die Milchsäurebildung nur eine Sekundärerscheinung darstellt, keineswegs aber die Ursache des Kontrakturvorganges sein kann.

Tabelle VI.

Langdauernde Versuche mit KCl.

Nr.	Datum 1926	Zahl und Art der Frösche	Muskelgewicht g	Erst Aufenthalt in Ringer Min.	Danach Aufenthalt in Ringer + 0,1 % KCl Min.	Gesamte Milch- säure mg
1	2. VIII.	3 Temp.	r. 1,79	35	5	2,43
		3 "	l. 1,80 (Kontrollmuskel)	35	—	1,32
2	6. VIII.	3 "	r. 2,62	40	15	3,12
		3 "	l. 2,60 "	40	—	2,44
3	8. VII.	3 "	r. 2,67	60	+ 1 % KCl 5	2,68
		3 "	l. 2,70 "	60	—	1,78
4	13. VII.	3 Escl.	r. 1,68	45	5	1,71
		3 "	l. 1,71 "	45	—	1,26
5	23. VII.	3 "	r. 2,60	40	10	3,03
		3 "	l. 2,65 "	40	—	1,53
6	24. VII.	4 Temp.	r. 2,90	45	15	4,38
		4 "	l. 2,96 "	45	—	2,16
7	21. VII.	3 Escl.	r. 2,41	35	60	3,82
		3 "	l. 2,50 "	35	—	1,44

Tabelle VII.

Langdauernde Versuche mit Chinin.

Nr.	Datum 1926	Zahl und Art der Frösche	Muskelgewicht g	Erst Aufenthalt in Ringer Min.	Danach Aufenthalt in Ringer + 0,5 % Chin. hydr. Min.	Gesamte Milchsäure mg
1	8. IX.	4 Temp.	r. 2,10	60	4	2,34
		4 "	l. 2,15 (Kontrollmuskel)	70	—	1,76
2	20. VIII.	4 "	r. 2,10	45	30	5,94
		4 "	l. 2,15 "	75	—	1,30
3	23. VIII.	4 "	r. 2,24	45	+ 0,1 % Chin. hydr. 6	1,51
		4 "	l. 2,30 "	50	—	1,17
4	23. VIII.	4 "	r. 2,10	55	15	2,50
		4 "	l. 2,06 "	75	—	0,80
5	20. VIII.	4 "	r. 2,23	45	30	5,27
		4 "	l. 2,20 "	75	—	1,60
6	6. X.	3 "	r. 2,29	60	+ 0,2 % Chin. hydr. 5	1,91
		3 "	l. 2,30 "	65	—	1,62

Tabelle VIII.

Langdauernde Versuche mit Ammoniak.

Nr.	Datum 1926	Zahl und Art der Frösche	Muskelgewicht g	Erst Aufenthalt in Ringer Min.	Danach Aufenthalt in Ringer + 0,2% NH ₄ OH Min.	Gesamte Milchsäure mg
1	13. IX.	3 Temp.	r. 2,05	80	5	1,48
		3 "	l. 2,00 (Kontrollmuskel)	85	—	1,19
2	3. XI.	3 "	r. 2,11	120	15	3,01
		3 "	l. 2,10 "	135	—	1,78

Tabelle IX.

Langdauernde Versuche mit Chloroform.

Nr.	Datum 1926	Zahl und Art der Frösche	Muskelgewicht g	Erst Aufenthalt in Ringer Min.	Danach Aufenthalt in mit Chloroform gesättigter Ringerlsg. Min.	Gesamte Milchsäure g
1	4. XI.	3 Temp.	r. 2,20	60	1 1/2	1,29
		3 "	l. 2,25 (Kontrollmuskel)	60	—	0,94
2	20. XI.	3 "	r. 2,12	60	15	4,63
		3 "	l. 2,10 "	75	—	1,31

Tabelle X.

Langdauernde Versuche mit Acetylcholin.

Nr.	Datum 1926	Zahl und Art der Frösche	Muskelgewicht g	Erst Aufenthalt in Ringer Min.	Danach Aufenthalt in Ringer + Acetyl- cholin 1:20000 Min.	Gesamte Milchsäure mg
1	26. VIII.	5 Temp.	r. 2,19	30	8	0,91
		5 "	l. 2,14 (Kontrollmuskel)	40	—	1,02
2	26. VIII.	5 "	r. 2,18	75	15	1,11
		5 "	l. 2,20 "	90	—	1,06
					+ Acetyl- cholin 1:4000	
3	30. VIII.	5 "	r. 1,88	60	30	1,11
		5 "	l. 1,83 "	90	—	1,35
4	8. IX.	5 "	r. 1,99	90	120	1,55
		5 "	l. 2,02 "	210	—	1,35

Ist die Milchsäure nicht die Ursache der tonischen Kontraktion, so könnte sie immerhin beim Ablauf der im Anschluß an die tonische Kontraktion sich abspielenden Vorgänge irgend eine Rolle spielen. Hier erheben sich aber Bedenken, wenn man berücksichtigt, daß im Verlauf der nach Acetylcholin einsetzenden Tonussteigerung eine erhöhte Milchsäurebildung überhaupt nicht nachweisbar ist. Da die Tonussteigerung nach Acetylcholin, wie aus Abb. 7 hervorgeht, eine sehr langdauernde ist, so ist sicher, daß bei den mit dem Tonus zusammenhängenden Vorgängen die Milchsäure gar keine Rolle zu spielen braucht. Da die Tonuszunahme nach Kalium, Chinin, Chloroform usw. in ihrem mechanischen Ablauf sich nicht wesentlich von der Acetylcholinkontraktur unterscheidet, so erschien es uns mehr als zweifelhaft, daß die Milchsäure bei der Wirkung dieser Substanzen auch nur als Sekundärerscheinung mit dem Tonus zusammenhängen sollte. Die Gleichförmigkeit, die sonst zwischen der Wirkung der Vagusstoffe und der des Kaliums besteht, ließ es uns unerklärlich erscheinen, weshalb in dem einen Falle der Tonusablauf *ohne*, in dem anderen Falle *mit* erhöhter Milchsäurebildung einhergehen sollte. Wir erwogen daher, ob die Milchsäurebildung nicht die Folge einer Schädigung der gesamten Muskelsubstanz darstellen könnte. Daß Muskelschädigung zu Milchsäurebildung führt, ist bekannt. So wissen wir aus Untersuchungen von *Meyerhof*¹, daß Zerschneidung der Muskulatur, also eine mechanische Schädigung des Muskels, von einem starken Anstieg der Milchsäureproduktion begleitet ist. Es war deshalb zu prüfen, ob in den Fällen, in denen wir zusammen mit dem Tonusablauf eine Steigerung der Milchsäureproduktion nachweisen konnten, das Plus an Milchsäure nicht auf eine chemische Schädigung des Muskels durch die zugeführten Substanzen zurückzuführen sei. Das Ergebnis war ein durchaus positives. Wir untersuchten 1. ob die durch die Kontrakturmittel hervorgerufenen Tonusänderungen reversibel oder irreversibel sind; 2. ob der tonisierte Muskel durch elektrische Reize erregbar oder unerregbar ist. Was das Chinin, Chloroform und Ammoniak betrifft, so stellte sich heraus, daß bei den von uns angewandten Konzentrationen und nach Einwirkung einer bestimmten Zeit eine Reversibilität nicht mehr möglich ist, auch wenn ein mehrmaliges Auswaschen des Muskels mit Ringerlösung vorgenommen wird. Beim Chloroform (s. Abb. 3) schwindet die Reversibilität bereits nach einer Einwirkungsdauer von kaum einer Minute, beim Chinin (s. Abb. 4) nach etwa 10 bis 20 Minuten. Beim Kalium ist eine Reversibilität nach Auswaschen möglich, doch kehrt

¹ O. Meyerhof, Pflügers Arch. 188, 114, 1921; Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. (Bethe, v. Bergmann, Embden, Ellinger) 8, 1. Hälfte, 1. Teil, S. 492.

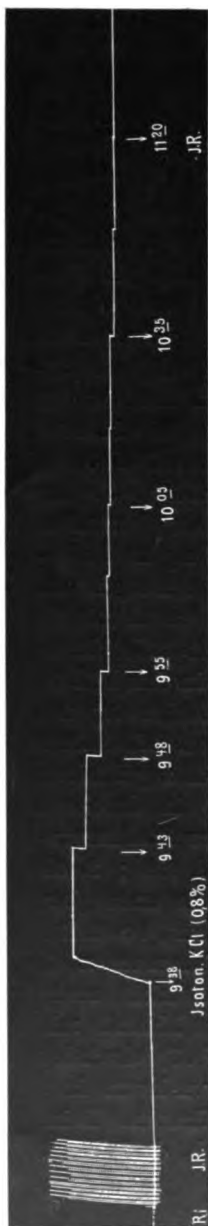


Abb. 5.



Abb. 6.



Abb. 7.



Abb. 8.

Ri = Ringer. J.R. = Induktionsreize. Isoton. = Isotonische Lösung.

der ursprüngliche Zustand erst langsam zurück. Nennenswerte Unterschiede zwischen verschiedenen Kalisalzen (KCl , K_2SO_4) konnten wir sowohl in dieser Hinsicht als auch in bezug auf die Milchsäurebildung nicht feststellen. Die schnellste Reversibilität ist beim Acetylcholin festzustellen. Der Muskel erreicht bereits sofort nach der ersten Auswaschung, besonders wenn er gleichzeitig mit Induktionsschlägen gereizt wird, seine ursprüngliche Einstellung wieder. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß auch *Riesser*¹ von einem anderen Gesichtspunkte ausgehend, zu der Ansicht gekommen ist, daß Substanzen wie Chloroform und Ammoniak auf den Muskel schädigend einwirken müssen.

Die deutlichsten Unterschiede bestehen in dem Verhalten des Muskels hinsichtlich seiner Erregbarkeit. Hat Chloroform (s. Abb. 3), Chinin (s. Abb. 4) oder Ammoniak (s. Abb. 2) eine bestimmte Zeit auf den Muskel eingewirkt, so ist der Muskel elektrischen Reizen gegenüber vollkommen unerregbar; er büßt seine Zuckungsfähigkeit ein und erlangt sie nie wieder. Der Kaliummuskel verliert seine Zuckungsfähigkeit selbst dann, wenn die Kontraktur noch während des Aufenthalts des Muskels in der Kaliumlösung zurückgegangen ist (s. Abb. 5 und 6). Die Erregbarkeit kehrt bestenfalls erst nach mehrmaligem Auswaschen des Muskels mit Ringerlösung und längerem Abwarten wieder, vorausgesetzt, daß das Auswaschen rechtzeitig geschieht. Haben die genannten Substanzen, so das Chinin und Kalium, in schwächeren Konzentrationen und nur kürzere Zeit — etwa 5 bis 10 Minuten — eingewirkt, so ist die Reizbarkeit zum mindesten eine wesentlich geringere geworden. Das Acetylcholin verhält sich ganz anders als die bisher genannten Substanzen. Selbst auf der Höhe der Acetylcholin-kontraktur (s. Abb. 7 und 8) behält der Muskel seine volle Erregbarkeit für Induktionsschläge bei. Man kann nicht einmal von einer Herabsetzung der Erregbarkeit sprechen; denn selbst der Ablauf der Schließungs- und Öffnungszuckung ist genau derselbe wie bei Beginn des Versuchs vor Zusatz des Acetylcholins. Daß die ersten Reize bei dem durch Acetylcholin kontrahierten Muskel nicht die gleiche Zuckungshöhe hervorrufen wie bei Beginn des Versuchs vor Zusatz des Acetylcholins, ist nur rein mechanisch bedingt.

Fassen wir das Ergebnis dieser Versuche zusammen, so müssen wir folgendes feststellen: Allein das Acetylcholin ruft eine Tonussteigerung (Muskelkontraktur) hervor, die schnell reversibel ist, und führt zu tonischen Veränderungen, bei denen der Muskel seine Zuckungsfähigkeit unverändert beibehält. Alle übrigen von uns unter-

¹ Pflügers Arch. 208, 522, 1925.

suchten, kontrakturerzeugenden Substanzen verhalten sich anders. *Sie führen zu einer mehr oder weniger irreversiblen Kontraktur des Muskels und bedingen früher oder später einen Verlust der Muskeleerregbarkeit. Sie allein sind aber auch die Substanzen, welche im Gegensatz zum Acetylcholin eine erhöhte Milchsäurebildung hervorrufen.*

Von einer physiologischen Tonuszunahme des Muskels müssen wir verlangen, daß sie unbedingt und schnell reversibel ist und daß durch sie die Muskeleerregbarkeit nicht verloren geht; letzteres ist auch aus der Physiologie und Pathologie bekannt. Es sei nur an das Verhalten des Muskels bei Krankheitszuständen erinnert, die mit starker Muskelrigidität einhergehen, so z. B. bei Erkrankungen des Corpus striatum (Paralysis agitans). In diesen Fällen schwindet bekanntlich die Erregbarkeit des Muskels auf elektrische Reize nicht. Eine Veränderung der Muskeleerregbarkeit finden wir in der Pathologie nur bei Erkrankungen des zweiten motorischen Neurons bzw. bei rein peripheren Lähmungen, also bei Veränderungen, die an das animalische System gebunden sind. Die Tatsache, daß Substanzen wie Chinin, Chloroform u. a. zum Schwinden der Muskeleerregbarkeit führen, spricht dafür, daß ihre Wirkung nicht allein auf das vegetative, d. h. den tonischen Ablauf bedingenden Anteil des Muskels beschränkt bleibt, sondern auch auf das der animalischen Funktion des Muskels (der Zuckung) zugrunde liegende Betriebsstück im Sinne einer Schädigung einwirkt. Unter den von uns untersuchten Substanzen ruft allein das Acetylcholin eine Kontraktur hervor, *die als der physiologischen, unter den Bedingungen des Lebens eintretenden als nahestehend bzw. gleichartig angesehen werden kann. Sie ist aber auch diejenige, die ganz ohne Milchsäurebildung einhergeht.*

Die Bedeutung der Milchsäure für die Zuckung des quergestreiften Muskels kann als eine umstrittene angesehen werden. Gegen die vielfach vertretene Anschauung, daß die Milchsäure die Ursache der Zuckung sei, lassen sich eine Reihe großer Bedenken geltend machen. Hingewiesen sei in diesem Zusammenhang nochmals auf die wichtigen, neueren Untersuchungen *Embdens*¹ und seiner Schüler; immerhin geht auch aus ihnen hervor, daß Milchsäure bei der Muskelzuckung gebildet wird und daher bei den Gesamtvorgängen, die die Muskelzuckung begleiten, eine Rolle spielen dürfte. *Bei der tonischen Muskelkontraktion kommt demgegenüber der Milchsäurebildung, wie wir durch die vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen zu haben glauben, überhaupt keine Bedeutung zu. Die Milchsäure ist nicht nur nicht die Ursache der tonischen Muskelkontraktion, sondern sie begleitet sie nicht einmal.*

¹ l. c.

Soweit im Experiment durch die tonussteigernd wirkenden Substanzen eine Milchsäurebildung hervorgerufen wird, ist sie nicht als Folge der Tonuswirkung, sondern als Folge des schädlichen Einflusses aufzufassen, den die Substanzen auf die gesamte Muskulatur, insbesondere auf das der Muskelzuckung zugrunde liegende Muskelbetriebsstück ausüben.

Alle Einteilungen der tonischen Kontrakturen unter dem Gesichtspunkte der Milchsäurebildung sind nicht berechtigt und müssen fallen gelassen werden; denn sie gehen nur von einem Nebenumstand und nicht vom Wesen der Vorgänge aus. Die Tonussteigerung des Muskels durch die kontrakturerzeugenden Substanzen muß — wie auch *Bethe* annimmt — als eine direkte Wirkung der Gifte bzw. Elektrolyte auf die Muskelplasmasubstanz angesehen werden.

Der Milchsäure kommt für die Auslösung der tonischen Muskelkontraktion keine spezielle Bedeutung zu.

Zur Elementaranalyse stickstoffhaltiger Körper.

Von

Helmut Müller.

[Aus dem Physiologischen Institut der Universität Königsberg (Pr.).]

(Eingegangen am 27. Juni 1927.)

In vorangegangenen Mitteilungen (1) „über den Oxydationsquotienten“ habe ich den Begriff des „Vakatsauerstoff“ aufgestellt. Ich verstehe darunter die Sauerstoffmenge, die eine Substanz bei völliger Verbrennung zu den Endprodukten des tierischen Stoffwechsels noch aufzunehmen vermöchte. Ihre Bestimmung ergibt ein genaues Maß des Oxydationszustandes der betreffenden Substanz und erfolgt mit einer Methodik, die *Strebing* (2) im Jahre 1919 zur Bestimmung des Sauerstoffgehalts organischer Substanzen angegeben hat. Ihr Prinzip beruht darauf, daß die Substanz mit Schwefelsäure unter Zusatz bekannter Mengen von Kaliumjodat verbrannt und aus dem Verbrauch an letzterem die Menge Sauerstoff ermittelt wird, die dabei aufgenommen ist. Die Differenz zwischen dieser Sauerstoffmenge und derjenigen, die der in der Substanz enthaltene Kohlenstoff, Wasserstoff usw. verbrauchen, gibt an, wieviel Sauerstoff der untersuchte Körper bereits enthielt. Für die Bestimmung ist also die Kenntnis des Gehalts der Substanz an anderen Elementen vorausgesetzt. Es handelt sich demnach im Grunde nur um eine Kontrolle dieser Werte, da ja der Sauerstoffgehalt schon ohne Analyse als Ergänzung der Prozentzahlen der übrigen Elemente zu 100 ermittelt werden kann.

Der Wert der Methode *Strebingers*, soweit sie zur Bestimmung des Oxydationsquotienten und damit zur Untersuchung biologischer Fragen dient, ist in der erwähnten ersten Mitteilung ausführlich auseinandergesetzt, in der folgenden Abhandlung soll gezeigt werden, daß auch das Anwendungsgebiet für die Elementaranalyse (insbesondere stickstoffhaltiger Substanzen) sich nicht auf die Kontrolle der Kohlen-

stoffwasserstoffbestimmung beschränkt, sondern ein viel weiteres ist. Man kann nämlich, wenn man in einer kohlenstoff-, wasserstoff- und stickstoffhaltigen Substanz den Stickstoffgehalt und Vakatsauerstoff kennt, also durch alleinige Bestimmung des Oxydationsquotienten, auch den Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt für fast alle, wenigstens für den Biochemiker in Frage kommenden Fälle ermitteln, d. h. die Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung umgehen.

Dies beruht einmal darauf, daß die in Frage kommenden Substanzen wohl kaum jemals mehr als je sechs Stickstoff- bzw. Sauerstoffatome im Molekül haben, ferner darauf, daß für das Verhältnis der Kohlenstoff- zu den Wasserstoffatomen ein Maximum und ein Minimum besteht, und schließlich darauf, daß die Sauerstoffmengen, die der Kohlenstoff bzw. Wasserstoff bei der Verbrennung verbrauchen, außerordentlich verschieden sind; 1 g C nimmt bei der Oxydation 2,66 g O, 1 g H dagegen 8 g O auf.

Im folgenden sollen die Formeln abgeleitet werden, die zur Ermittlung des C- und H-Gehalts aus dem N-Gehalt und dem Vakatsauerstoff führen:

Es seien C, H, N, O die in den unbekannten Substanzen enthaltenen Mengen an Kohlenstoff, Wasserstoff usw., S ihr Vakatsauerstoff in Prozenten. Dann ist

$$C + H + N + O = 100 \quad (1)$$

Nun nimmt 1 Atom C bei der Verbrennung 2 Atome O, also 12 g C 32 g oder 1 g C 2,66 g O auf und entsprechend 1 g H 8 g O. 1 Atom N verbindet sich mit 3 Atomen H zu NH_3 , spart also die 3 H entsprechende Menge Sauerstoff, d. h. $1\frac{1}{2}$ Atome O; 14 g N sparen also $1\frac{1}{2} \cdot 16 = 24$ g O, 1 g N 1,71 g O.

Demnach ist

$$2,66 C + 8 H - 1,71 N - O = S, \quad (2)$$

nach Gleichung (1) ist:

$$\begin{array}{r} 8 C + 8 H + 8 N + 8 O = 800 \\ 5,34 C + 9,71 N + 9 O = 800 - S \\ 5,34 C = 800 - S - 9,71 N - 9 O \end{array} \quad (3)$$

In entsprechender Weise ergibt sich für H:

$$\begin{array}{r} 2,66 C + 8 H - 1,71 N - O = S \\ 2,66 C + 2,66 H + 2,66 N + 2,66 O = 266 \\ 5,34 H - 4,37 N - 3,66 O = S - 266 \\ 5,34 H = S - 266 + 4,37 N + 3,66 O \end{array} \quad (4)$$

Bezeichnen wir mit c, h, n, o die Zahl der in der Substanz enthaltenen Kohlenstoff- usw. -atome, so ist:

$$\frac{C}{N} = \frac{12 c}{14 n}; \quad \frac{H}{N} = \frac{h}{14 n}; \quad \frac{O}{N} = \frac{16 o}{14 n}.$$

Durch Einsetzen dieser Werte erhalten wir aus Gleichung (3):

$$4,58 \, c/n \cdot N = 800 - S - 9,71 \, N - 10,29 \, o/n \, N$$

$$c = \left(\frac{800 - S}{4,58 \, N} - 2,12 \right) n - 2,25 \, o$$

oder, wenn $\frac{800 - S}{4,58 \, N} - 2,12 = a,$

$$c = a \cdot n - 2,25 \, o. \quad (5)$$

Entsprechend aus Gleichung (4):

$$0,38 \, h/n \, N = S - 266 + 4,37 \, N + 4,18 \, o/n \, N$$

$$h = \left(\frac{S - 266}{0,38 \, N} + 11,5 \right) n + 11 \, o$$

oder, wenn $\frac{S - 266}{0,38 \, N} + 11,5 = b,$

$$h = b \cdot n + 11 \, o. \quad (6)$$

Aus (5) und (6) folgt:

$$\frac{c}{h} = \frac{a \cdot n - 2,25 \, o}{b \cdot n + 11 \, o} = \frac{a \cdot n/o - 2,25}{b \cdot n/o + 11}. \quad (7)$$

Es dürfte kaum für uns in Frage kommende N-haltige Körper geben, in denen $c/h > 1,25$ ist, und mit Ausnahme weniger niederer Amine ist c/h auch nie $< 0,25$. Wir bekommen demnach zwei Grenzfälle, die durch die Gleichungen $c/h = 1,25$ und $c/h = 0,25$ bestimmt sind. Setzen wir diese Werte in (7) ein, so erhalten wir:

1. Grenzfall:

$$1,25 = \frac{a \cdot n/o - 2,25}{b \cdot n/o + 11},$$

$$n/o (a - 1,25 \, b) = 16$$

$$n/o \, \max = \frac{16}{a - 1,25 \, b}.$$

2. Grenzfall:

$$0,25 = \frac{a \cdot n/o - 2,25}{b \cdot n/o + 11},$$

$$n/o (a - 0,25 \, b) = 5$$

$$n/o \, \min = \frac{5}{a - 0,25 \, b}.$$

Machen wir nun die zweite Annahme, die ebenfalls fast immer zulässig ist (von ganz hoch molekularen Stoffen wie den Eiweißkörpern müssen wir absehen), daß die untersuchte Substanz nicht mehr als je 6 N- bzw. O-Atome besitzt, so kommen für das Verhältnis n/o nur eine beschränkte Zahl von Werten (24) in Frage. Durch die obigen Grenzgleichungen können wir diese Möglichkeiten fast immer auf eine oder wenige einschränken, unter denen dann leicht zu entscheiden ist. Die in Betracht kommenden Werte für n/o zeigt die Tabelle.

Zahl der Atome N	1	1	1	1 (2)	2	1 (2, 3)	3	2 (4)	3	4	5
Zahl der Atome O	6	5	4	3 (6)	5	2 (4, 6)	5	3 (6)	4	5	6
n/o	0,17	0,20	0,25	0,33	0,40	0,50	0,60	0,66	0,75	0,80	0,83

Zahl der Atome N	1 (—6)	6	5	4	3 (6)	5	2 (4, 6)	5	3 (6)	4	1
Zahl der Atome O	1 (—6)	5	4	3	2 (4)	3	1 (2, 3)	2	1 (2)	1	5
n/o	1,0	1,2	1,25	1,33	1,5	1,66	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0

Zahl der Atome N . . .	6	1—6
Zahl der Atome O . . .	1	0
n/o	6,0	∞

Einige Beispiele mögen das Gesagte erläutern:

1. Beispiel:

Glykokoll, $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, Molekulargewicht 75,04, N = 18,66, nimmt 3 Atome O auf, also S = 64, n/o = 0,5.

$$a = \frac{800 - S}{4,58 N} - 2,12 = 6,492,$$

$$b = \frac{S - 266}{0,38 N} + 11,5 = -16,99,$$

$$n/o \text{ max} = \frac{16}{a - 1,25 b} = 0,577,$$

$$n/o \text{ min} = \frac{5}{a - 0,25 b} = 0,466.$$

Der richtige Wert für n/o liegt also zwischen 0,577 als Maximum und 0,466 als Minimum. Nach obiger Tabelle liegt in diesen Grenzen nur der Wert 0,5, der also das Verhältnis der N- zu den O-Atomen im Glykokoll anzeigt.

Nun läßt sich durch Einsetzen in Gleichung (5) bzw. (6) auch die Zahl der C- bzw. H-Atome ermitteln:

$$c = a \cdot n - 2,25 o = 6,492 - 4,50 = 1,992$$

$$h = b \cdot n + 11 o = -16,99 + 22 = 5,01$$

Die Summenformel der vorliegenden Verbindung ist also $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ (q. e. d.).

2. Beispiel: Harnsäure, $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$, Molekulargewicht 168,06, N = 33,33, nimmt 3 Atome O auf, also S = 28,55, n/o = 1,33.

$$a = \frac{800 - 28,55}{4,58 \cdot 33,33} - 2,12 = 2,934,$$

$$b = \frac{28,55 - 266}{0,38 \cdot 33,33} + 11,5 = -7,25,$$

$$n/o \text{ max} = \frac{16}{2,934 + 9,063} = 1,33,$$

$$n/o \text{ min} = \frac{5}{2,934 + 1,813} = 1,05.$$

In Frage kommen also die Werte 1,33, 1,25 und 1,2. Um zwischen diesen zu entscheiden, berechnen wir die Summenformeln der Verbindungen, die den drei Werten entsprechen würden.

a) $n/o = 1,33$; $n = 4$; $o = 3$;

$$c = a \cdot n - 2,25 o = 4,99$$

$$h = b \cdot n + 11 o = 4,00$$

Summenformel: $C_4H_4N_4O_3$.

b) $n/o = 1,25$; $n = 5$; $o = 4$;

$$c = 14,67 - 9,00 = 5,67$$

$$h = -36,25 + 44,00 = 7,75$$

c) $n/o = 1,2$; $n = 6$; $o = 5$;

$$c = 17,60 - 11,25 = 6,35$$

$$h = -43,50 + 55,0 = 11,50$$

Während sich also für $n/o = 1,33$ eine gut stimmende Summenformel ergibt, können wir mit den anderen Werten nicht zu einer solchen gelangen, da sich für c und h keine ganzzahligen Werte ergeben, also ist die Formel unter a) die gesuchte.

3. Beispiel: Glucosamin, $C_6H_{13}NO_4$, Molekulargewicht 179,1, nimmt 12 Atome O auf, also $S = 107,2$, $N = 7,82$, $n/o = 0,2$, $a = 17,22$, $b = -41,94$,

$$n/o \text{ max} = 0,23; n/o \text{ min} = 0,18,$$

n/o kann also nur 0,2 sein.

4. Beispiel: Tyrosin, $C_9H_{11}NO_3$, Molekulargewicht 181,1, nimmt 19 Atome O auf, also $S = 167,9$, $N = 7,73$, $n/o = 0,33$, $a = 15,73$, $b = -21,9$,

$$n/o \text{ max} = 0,37, n/o \text{ min} = 0,24.$$

In Frage kommen $n/o = 0,33$ und 0,25.

a) $n/o = 0,33$, $n = 1$, $o = 3$,

$$c = 15,73 - 6,75 = 8,98$$

$$h = -21,9 + 33 = 11,1$$

Summenformel: $C_9H_{11}NO_3$.

b) $n/o = 0,25$, $n = 1$, $o = 4$,

$$c = 15,73 - 9,0 = 6,73$$

$$h = -21,9 + 44 = 22,1$$

gibt keine gute Summenformel, folglich muß die Formel unter a) als die richtige angesprochen werden.

5. Beispiel: Harnstoff, CH_4N_2O , $N = 46,66$, $S = 0$, $n/o = 2$, $a = 1,62$, $b = -3,5$,

$$n/o \text{ max} = 2,67, n/o \text{ min} = 2,0.$$

In Betracht kommen $n/o = 2,5$ und 2,0.

a) $n/o = 2,5$; $n = 5$; $o = 2$;

$$c = 8,1 - 4,5 = 3,6$$

$$h = -17,5 + 22 = 4,5$$

b) $n/o = 2,0$; $n = 2$ (4, 6); $o = 1$ (2, 3);

$$c = 3,24 - 2,25 = 0,99$$

$$h = -7 + 11 = 4,0$$

Summenformel: $C_1H_4N_2O_1$.

6. Beispiel: Am Beispiel des Methylguanidins soll das Verhalten sauerstofffreier Substanzen gezeigt werden.

$$\text{C}_2\text{H}_7\text{N}_3; \text{N} = 57,49; \text{S} = 65,70; n/o = \infty$$

$$a = 0,67; b = + 2,33$$

$$n/o \text{ max} = - 7,1; n/o \text{ min} = + 55,5,$$

n/o ist also $> 55,5$, während das Maximum einen negativen Wert hat, dazu paßt nur ein $n/o = \infty$, d. h. die Substanz ist sauerstofffrei. Demnach ist:

$$c = a \cdot n \quad \text{und} \quad h = b \cdot n.$$

Um zur Formel zu gelangen, müssen wir für n steigende Werte einsetzen, bis sich für c und h ganze Zahlen ergeben:

$$n = 1; \quad c = 0,67; \quad h = 2,33;$$

$$n = 2; \quad c = 1,34; \quad h = 4,66;$$

$$n = 3; \quad c = 2,01; \quad h = 6,99.$$

Die Summenformel der fraglichen Substanz ist also $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}_3$.

Der Einfluß der Analysenfehler.

In allen diesen Beispielen waren für N und S die genau stimmenden, errechneten Zahlen eingesetzt. Wir müssen uns fragen, ob die Ermittlung der Zusammensetzung einer unbekannten Substanz auch dann noch so sicher möglich ist, wenn uns statt der genauen die durch den Versuch ermittelten, mit Fehlerquellen behafteten Werte zur Verfügung stehen.

Aus den obigen Formeln ergibt sich, daß die Fehler die größte Abweichung des Ergebnisses bedingen, wenn sie für S und N sich in gleicher Richtung bewegen. Der Einfluß dieser Fehler möge an dem Beispiel 2 gezeigt werden. Wir wollen den ungünstigen Fall betrachten, daß sowohl N wie S um 0,5 % (also außerhalb der eigentlichen Fehlerquelle) zu hoch gefunden seien. Wir hätten dann:

Beispiel 2a: Harnsäure, $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$,

N berechnet 33,33, S berechnet 28,55;

N gefunden 33,83; S gefunden 29,05;

$$a = 2,857; b = - 6,93;$$

$$n/o \text{ max} = 1,389; n/o \text{ min} = 1,089.$$

Für n/o kommen also wieder in Frage: 1,33, 1,25, 1,20.

a) $n/o = 1,33; n = 4; o = 3;$

$$c = 4,68; \quad h = 5,28.$$

b) $n/o = 1,25; n = 5; o = 4;$

$$c = 5,29; \quad h = 9,35.$$

c) $n/o = 1,20; n = 6; o = 5;$

$$c = 5,89; \quad h = 13,42.$$

Vergleichen wir diese Zahlen mit denen, die wir mit den richtigen Werten für N und S gefunden haben, so sehen wir, daß das Maximum und Minimum für n/o nicht wesentlich verändert wird, daß aber die Werte für c und h so sehr abweichen, daß man daraus nicht ohne weiteres die richtigen Formeln erschließen, ja sogar leicht auf eine falsche Fährte kommen kann. So hat es im Falle a) des obigen Beispiels doch entschieden den Anschein, als sei der richtige Wert für $h = 5$, während Harnsäure ja vier Wasserstoffatome enthält. Hier führt die folgende Überlegung zum Ziel: Wenn sich N ändert, so ändern sich damit c und h , und zwar in einem ganz bestimmten Verhältnis, das für jedes S ein gegebenes ist, also nur von diesem abhängt. Dies erhellt aus folgenden Gleichungen:

Es seien c und h die richtigen, c_1 und h_1 die gefundenen Werte für die Zahl der C- und H-Atome, N und N_1 die entsprechenden Stickstoffwerte, dann ist:

$$c = \left(\frac{u}{N} - 2,12 \right) n - 2,25 o, \quad \text{wobei } u = \frac{800 - S}{4,58},$$

$$c_1 = \left(\frac{u}{N_1} - 2,12 \right) n - 2,25 o$$

$$\frac{c - c_1}{c - c_1} = n \cdot u \left(\frac{1}{N} - \frac{1}{N_1} \right)$$

$$h = \left(\frac{v}{N} + 11,5 \right) n + 11 o, \quad \text{wobei } v = \frac{S - 266}{0,38},$$

$$h_1 = \left(\frac{v}{N_1} + 11,5 \right) n + 11 o$$

$$\frac{h - h_1}{h - h_1} = n \cdot v \left(\frac{1}{N} - \frac{1}{N_1} \right),$$

$$\frac{c - c_1}{h - h_1} = \frac{u}{v}.$$

Der Fehler von S verändert das Verhältnis u/v nur wenig, so daß wir unbedenklich den gefundenen Wert einsetzen können. In unserem Beispiel finden wir

$$\begin{array}{lll} u/v = -0,27 & & \frac{c - c_1}{h - h_1} = -1,14, \\ c - c_1 \text{ ist im Falle a) } = 0,32, & & \\ h - h_1 \text{ für } h = 5 & = -0,28 & \frac{c - c_1}{h - h_1} = -0,25. \\ \text{„ } h = 4 & = -1,28 & \end{array}$$

Es ist klar, daß $h = 4$ sein muß. In den Fällen b) und c) gelingt es überhaupt nicht, einen Wert für $\frac{c - c_1}{h - h_1}$ zu bekommen, der u/v nahekommt, demnach ist die Formel unter a) die gesuchte.

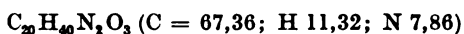
Wo es nicht gelingt, in dieser Weise die Entscheidung zu treffen, wird meist schon die genauere Betrachtung der gefundenen Formeln

die Zweifel heben. Aber auch in den wenigen Fällen, wo auf diese Weise keine Entscheidung zu treffen und also die C-H-Bestimmung nicht zu umgehen ist, wird die Ermittlung des Vakatsauerstoffs sehr gute Dienste leisten als Kontrolle der ersteren und zur Entscheidung der Fälle, in denen nach der C-, H- und N-Bestimmung noch mehrere Formeln in Frage kommen.

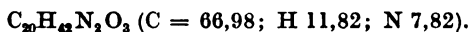
Zwei willkürlich gewählte Beispiele mögen dies zeigen:

a) Es sei gefunden C = 67,1; H = 11,6; N = 7,8 %.

Dazu paßt sowohl die Formel:



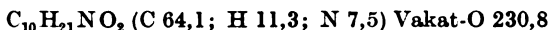
wie



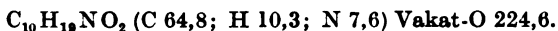
Die Werte für C, H, N, O liegen so nahe aneinander, daß eine Entscheidung durch die Elementaranalyse nicht getroffen werden kann. Hier vermag die Bestimmung des Vakatsauerstoffs zu entscheiden: Der erste Körper hat 242,5 % Vak.-O, der zweite 245,6 %, also Zahlen, die außerhalb der Fehlergrenze der Methodik liegen und daher die Entscheidung zwischen beiden Formeln gestatten.

b) Es sei gefunden C 64,4; H 10,8; N 7,4 %.

Dem entsprechen am besten die Formeln:



und



Auch hier ist es klar, daß die Entscheidung durch die Bestimmung des Vak.-O erbracht werden kann.

Wie steht es nun mit der Bestimmung des Vakatsauerstoffs in N-freien Substanzen? Zwar wird man hier in einer Reihe von Fällen auch ohne die C—H-Bestimmung zu einer Entscheidung gelangen können, aber meist werden mehrere Möglichkeiten bleiben, zwischen denen nur durch die Kohlenstoff-Wasserstoffbestimmung entschieden werden kann¹; ich verzichte darum auf die Ableitung der hier in Frage kommenden Formeln. Selbstverständlich ist es, daß auch hier die Bestimmung des Vak.-O ausgezeichnete Dienste leistet in der Kontrolle der C—H-Bestimmungen und vor allem dort, wo aus letzteren allein die Entscheidung über die Zusammensetzung der betreffenden Verbindung nicht getroffen werden kann.

¹ Und zwar ist, je höher der Wert für den Vak.-O ist, um so größer die Zahl der möglichen Werte, um so geringer also die Anwendbarkeit des Prinzips.

Ebensowenig bedarf es der Erwähnung, daß in Substanzen, die außer C, H und O noch andere Elemente enthalten, z. B. bei Metallsalzen, durch die Bestimmung dieses Elementes und des Vakuo-O vielfach die C—H-Bestimmung umgangen werden kann. Die dabei in Anwendung kommenden Formeln müssen von Fall zu Fall ermittelt werden, ihre allgemeine Ableitung würde daher hier zu weit führen.

Literatur.

- 1) H. Müller, *Klin. Wochenschr.* 1926, 5. Jahrg., Nr. 48; *Derselbe*, *diese Zeitschr.* 186, 451, 1927. — 2) *Strebing*, *Zeitschr. f. analyt. Chem.* 58, 97, 1919.
-

Untersuchungen über Cytolyse beim Krebs. II.

Von

N. Waterman und L. de Kromme.

(Aus dem Laboratorium des Antonie van Leeuwenhoekhuis, Amsterdam.)

(Eingegangen am 25. Juni 1927.)

In unserer ersten Mitteilung¹ konnten wir folgendes zeigen:

1. Sera und Hautextrakte normaler Menschen und Tiere besitzen tumorzellenlösende Eigenschaften.

2. Im Gegensatz hierzu besitzen Sera und Hautextrakte von Carcinomatösen diese Eigenschaft im allgemeinen nicht.

3. Im präcarcinomatösen Stadium ist bei einigen Tieren das lytische Vermögen noch nachweisbar, während es bei anderen schon fehlt.

Der letzte Befund beweist wohl zur Genüge, daß der im Körper sich entwickelnde Tumor nicht die Abwesenheit lytischer Faktoren bedingt (Ausscheidung von nekrotischen Stoffen u. a.), sondern daß im Gegenteil dieses Fehlen ein wichtiger prädisponierender Umstand ist, der erst die Tumorgenese ermöglicht.

Daraus erklärt sich:

1. Sera von älteren Menschen wirken öfters nicht lytisch.

2. Mäuse, die einer gleichen Zahl von Teerpinselungen unterworfen wurden, zeigen sehr wechselndes lytisches Vermögen (auch weil die Anfangswerte bereits differieren).

3. Mäuse, die bis zum Papillomstadium gepinselt sind, lysieren öfters noch deutlich; wir bringen dies mit der Tatsache in Zusammenhang, daß Papillome mitunter noch resorbiert werden und es lange Zeit dauern kann, bis sich ein wirklich carcinomatöser Zustand einstellt.

4. Nach starker Vernichtung von Tumorzellen im Körper (durch Röntgenbestrahlung, Abszedierung, Injektion von Blei- und anderen Metallpräparaten), wobei große Mengen von Abbauprodukten resorbiert werden, besitzen die Sera und andere Körperflüssigkeiten fast ausnahmslos kräftige lysierende Eigenschaften.

¹ N. Waterman und L. de Kromme, diese Zeitschr. 182, 377, 1927.

5. Röntgenstrahlen beeinflussen das lytische Vermögen auf *diskontinuierliche* Weise, ferner auch¹, der Röntgeneffekt *in vivo* wirkt sich wahrscheinlich vermittelt einer solchen Veränderung des lytischen Vermögens des Milieus aus.

Obwohl diese Angaben unseren Einblick in die Pathogenese des Carcinoms vertiefen, bleiben noch viele Fragen ungelöst, technischer wie theoretischer Art, die weiteres Studium und Besprechung erheischen.

1. An erster Stelle harrt die Frage nach der Existenz und Wirkungsweise von schützenden Faktoren in der Tumorzelle, die bereits in unserer ersten Abhandlung gestellt, aber nicht definitiv beantwortet wurde, noch immer einer befriedigenden Erklärung.

In unseren fortgesetzten Untersuchungen hat diese Frage immer mehr an Bedeutung gewonnen, vor allem seit wir regelmäßig fanden, daß der zentrale Teil eines Tumors kräftig lytisch wirksam sein kann, während das Wachstum am Rande der Geschwulst dadurch *nicht* behindert wird. Zweifellos existieren hier schützende bzw. neutralisierende Faktoren, doch ist die Art und der Wirkungsmechanismus noch ungeklärt.

2. Auf einer Stufe mit dieser Frage steht die Beobachtung des Einflusses des Säuregrades auf den cytolytischen Prozeß, mit dem wir uns eingehend zu beschäftigen haben.

3. Zum Schluß soll der chemische Charakter des lytischen Stoffes und seine Darstellung behandelt werden.

Es scheint uns am besten, mit der Erörterung des dritten Punktes, *dem chemischen Charakter des lytischen Stoffes und seiner Darstellung* anzufangen. Dabei werden zugleich der Einfluß des Säuregrades und auch das Problem der unvollständigen Lysis behandelt werden. Dem Neutralisationsproblem widmen wir jedoch eine besondere Behandlung.

1. Isolierungsversuche.

Wir haben in unserer vorigen Mitteilung² angegeben, daß nicht nur normale *Sera*, sondern auch normale *Organe* krebszellenzerstörendes Vermögen besitzen. Diese Eigenschaft der Haut z. B. wurde eingehend untersucht.

Es entsteht nun sofort die Frage, ob sich alle Organe in dieser Beziehung gleich verhalten, oder aber, ob es im Körper ein *System* gibt, dem diese Eigenschaft in höherem Grade zukommt, mit anderen Worten, ob diese Körperfunktion, die als ein das Zellwachstum und den Zellverfall regulierender Faktor anzusehen ist, zentral reguliert ist.

¹ Siehe Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen **35**, H. **4**, 1927.

² l. c.

Ist dieses der Fall, so muß man gerade diesem System die lytische Substanz am leichtesten und meisten entziehen können.

Schon vor Jahren haben *Freund* und *Kaminer* auf die bedeutende krebszellenzerstörende Eigenschaft des Thymus hingewiesen, die das lytische Vermögen des Serums um mehrere Male übertreffen soll; ferner war nach Thymusexstirpation bei Hunden das lytische Vermögen sehr herabgesunken. Spätere Mitteilungen von belgischer Seite (*Dustin*) scheinen auch für die den Zellauf- und -abbau regulierende Funktion des Thymus zu sprechen.

Allein unser Interesse und die Versuche zur Isolierung aus diesem System wurden einigermaßen gehemmt durch die Angaben *Freund* und *Kaminers*, wonach die lytische Substanz eine ziemlich einfach gebaute gesättigte Dicarbonsäure mit einer ungeraden Zahl von C_2H_4 -Gruppen sein sollte. Einfache Repräsentanten dieser aktiven Gruppen waren: die Bernsteinsäure, Korksäure und Dekamethyldicarbonsäure, bei welchen der Wirkungsgrad mit der Länge der Kohlenstoffkette wächst.

Da die Substanz nun chemisch definiert war, schien es unnötig zu sein, die Isolierungsversuche weiter fortzusetzen.

Da uns aber niemals eine Nachprüfung dieser Angaben bekannt geworden war, haben wir uns zunächst bemüht, den lytischen Charakter einfacher Repräsentanten aus dieser Dicarbonsäurereihe zu untersuchen.

Auf die von *Freund* und *Kaminer* beschriebene Weise wurden Lösungen von Bernsteinsäure und später Korksäure mit Soda neutralisiert und auf ihre lytische Fähigkeit geprüft. Trotz vieler Sorgfalt haben wir uns aber zu unserem großen Erstaunen niemals von einer lytischen Wirkung überzeugen können.

Es fällt schwer, die Ursache einer solchen Diskrepanz bei einem relativ so einfachen Versuche anzugeben. Die Vermutung liegt am nächsten, daß dabei das p_H in diesem wässrigen Milieu, in welchem die Lysis stattfindet, eine ausschlaggebende Rolle gespielt hat. Spontane menschliche Tumorzellen, für den lytischen Versuch verwendet, sind außerordentlich empfindlich gegenüber schwach alkalischer Reaktion des Milieus; wenn der Alkaleszenzgrad zu hoch ist, zerfallen sie schon spontan sehr leicht. Ein kleiner Neutralisationsfehler kann dann bereits den Zellzerfall herbeiführen.

Da die lytische Kraft mit dem Alter abnimmt, haben wir die Organe junger Tiere (Kälber) zur Isolierung benutzt.

Wie *Freund* und *Kaminer* angeben und wir schon in unserer ersten Mitteilung in den Tabellen angeführt haben, läßt sich die lytische Substanz den Organen mit Äther entziehen. Das bedeutet natürlich nicht — und die neuere Hormonforschung gibt Veranlassung, diesen

Punkt hervorzuheben — daß die gesuchte Substanz wirklich ätherlöslich ist. Es ist sogar wahrscheinlich, daß sie nur von dem Äther und den darin gelösten Stoffen mitgerissen wird.

Zur Untersuchung gelangten: Leber, Milz, Lymphdrüsen, Thymus, Nebenniere, Pankreas — Haut war schon früher untersucht worden.

Gleich große Mengen der genannten Organe wurden mit der Fleischmaschine zerkleinert und ungetrocknet unter Rückflußkühlung mit reinem Äther während wenigstens 6 Stunden extrahiert. Eine Behandlung mit Aceton vor der Ätherextraktion ergab keine guten Resultate. Der Ätherextrakt wurde abdestilliert, die letzten Ätherreste mit Hilfe eines Luftstromes entfernt, das fetthaltige Residuum mit physiologischer Kochsalzlösung kräftig geschüttelt und darauf scharf zentrifugiert (5000 Touren). Es resultierten opaleszente Lösungen, die in vergleichbarer Weise auf ihr lytisches Vermögen untersucht wurden.

Die Technik der cytolytischen Untersuchung ist in unserer ersten Mitteilung beschrieben worden. Da aber jetzt mit wässrigen Lösungen gearbeitet wird, ist eine technische Verbesserung eingeführt worden, wodurch sich die Genauigkeit des Versuchs noch erhöht. Zur *Freundschen* Lösung (NaH_2PO_4 — NaCl), in der die Tumorzellen ausschließlich suspendiert werden, wurde $n/50$ Blutserum zugesetzt und die Lösung zur Abtötung der Fermente während 20 Minuten auf 60°C erwärmt. In dieser Kolloide enthaltenden Flüssigkeit ist die Verteilung der Zellen eine noch günstigere, und die Pipettierungsfehler werden noch mehr vermindert.

Selbst bei dieser recht unzulänglichen Darstellung ergaben sich beträchtliche Unterschiede in der Stärke der lytischen Wirkung von verschiedenen Organen.

Das Pankreas wurde sehr bald von der Untersuchung ausgeschlossen, da die Extrakte (auch später die gereinigten) tryptisch wirksam und somit unbrauchbar waren.

Tabelle I gibt einige Beispiele dieser ersten Versuche wieder. Obwohl alle Organextrakte mehr oder weniger lysieren (die Leber vielleicht nur schwach), nehmen schon hier Lymphdrüsen und Thymus die erste Stelle ein. Die Milz lieferte bei diesen orientierenden Versuchen zu stark getrübe und unreine Lösungen, um damit verwertbare Resultate zu erhalten. Es war daher eine eingehende Reinigung erforderlich. Nach verschiedenen Modifikationen erwies sich *vorläufig* folgendes Verfahren als das beste:

Die erwähnten Ätherextrakte wurden abgedampft, die letzten Ätherreste mit Hilfe eines Luftstromes entfernt und der wasserhaltige Rückstand mit Aceton in *großem Überschuß* behandelt. Dabei entstand ein flockiger weißer Niederschlag, der nach dem Absitzen wiederholt mit großen Mengen Acetons geschüttelt und schließlich abdekantiert wurde. Durch die Anwendung von Aceton erreicht man natürlich die Entfernung einiger Lipide und Farbstoffe.

Tabelle I.

Vergleich der lytischen Werte der einzelnen Organe nach einfacher Ätherextraktion und Lösung in physiologischer Kochsalzlösung. Vornahme des Versuchs bei $p_H < 7$.

Organ	Abnahme in absoluten Zahlen	Abnahme in ‰
Leber	120— 114	— 5
"	447— 635	+ 29
Milz	359— 321	— 2
"	381— 298	— 21
"	72— 50	— 30
"	839—1023	+ 21
Thymus	107— 74	— 31
Lymphdrüsen	108— 71	— 34
"	753— 643	— 14
"	226— 173	— 23
"	223— 127	— 48
Nebenniere	139— 111	— 20
Niere	231— 217	— 6
Pankreas	431— 263	— 39
Serum	415— 368	— 11

Nach dem Absitzenlassen der Fällung über Nacht wird das Aceton abgessen, der Niederschlag auf einem gehärteten Filter (*Schleicher und Schüll* Nr. 575) abfiltriert und im Brutschrank bei 37^0 getrocknet. Der Rückstand wird sodann nochmals mit Aceton in der Reibschale kräftig verrieben und wiederum auf einem gehärteten Filter abgesaugt. Die intensive Behandlung mit Aceton ist ein wichtiger Faktor bei der Darstellung.

Nach dem Trocknen resultiert ein weißliches, bröckliches Pulver; die Wägung ergibt, daß aus großen Mengen Organsubstanz nur einige Hundert Milligramme dieses Pulvers erhalten werden.

Beispiele:

1. Aus 100 g Lymphdrüsenbrei 340 mg Pulver
2. Aus 350 g Thymusbrei 410 mg Pulver

Dieses weißliche Pulver wurde nunmehr mit gepufferter Salzlösung ($p_H = 7,7$) kräftig geschüttelt und auf seine lytische Wirksamkeit geprüft.

In vergleichenden Untersuchungen zeigte sich nun besonders deutlich die Überlegenheit von Lymphdrüsen, Thymus sowie jetzt auch der Milz. Es hatte somit den Anschein, als ob nicht nur der Thymus, sondern der gesamte lymphocytäre Apparat, zu welchem nach dem Schema *Aschoffs* ja auch der Thymus gehört, lytische Fähigkeit in hervorragendem Maße besitzen.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der neueren Tumorforschung und vor allem mit den jüngsten Anschauungen über das Wesen der sogenannten Tumorimmunität wird man nicht fehlgehen in der Annahme, daß dem ganzen reticulo-endothelialen Apparat in dieser Beziehung eine große Bedeutung zuzuschreiben ist. Die nähere Begründung dieser Auffassung gehört jedoch nicht hierher.

Wir waren aber und sind auch jetzt noch nicht ans Ziel unserer Darstellungstechnik gelangt.

Fortgesetzte Versuche führten nämlich zu wechselnden Ergebnissen insofern, als der Grad der lytischen Wirksamkeit schwankte; schon rein äußerlich waren die Präparate bisweilen lipoidhaltig und ihre Lösungen opaleszierten. In solchen Lösungen kommt das lytische Phänomen nicht zustande, es findet im Gegenteil Zellschutz statt.

Eine gründlichere Reinigung war also unumgänglich erforderlich. Es wurden daher verschiedene andere Extraktionsmittel erprobt. Petroläther (40 bis 60°) erwies sich als ungeeignet, da bei der Filtration auch ein großer Teil der Substanz in die entstehende kolloidale Lösung mit überging. Nach einigen Vorversuchen lieferte schließlich die Reinigung mit gekühltem absoluten Alkohol die besten Resultate, obwohl wahrscheinlich auch hierbei Verluste stattfanden¹.

Das trockene Acetonpulver wurde in der Reibschale mit kleinen Portionen gekühlten Alkohols versetzt, der nicht lösliche Teil gleichfalls in kleinen Anteilen auf einem gehärteten Filter gesammelt und der Alkohol mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Der Niederschlag wurde wiederum im Brutschrank getrocknet, sodann mit der Phosphatpufferlösung nach *Sørensen* ($p_H = 7,7$) und mit physiologischer Kochsalzlösung vermischt (1 Teil Pufferlösung + 5 Teile physiologischer Kochsalzlösung) und kräftig geschüttelt. Hierbei darf keine Schaumbildung auftreten.

Jetzt erhielten wir in der Mehrzahl der Fälle klare oder nur sehr schwach opaleszierende Lösungen, die eine äußerst kräftige lytische Wirksamkeit entfalten konnten. Tabelle II gibt einige Beispiele wieder. Der Lysistiter betrug höchstens 81 %; voraussichtlich wird man aber die Wirksamkeit noch mehr erhöhen können. Über die Grenzen, die der Lysis gezogen sind, wird in der nächsten Mitteilung berichtet werden.

¹ *Nachtrag bei der Korrektur.* Der Niederschlag löst sich glatt in Benzol und Äther. Wenn sich mit der einfachen Alkoholreinigung keine klaren, lipoidfreien Lösungen erreichen lassen, ist es am besten, den Niederschlag wiederum in Äther zu lösen, zu konzentrieren, im Scheidetrichter mit der Pufferlösung auszuschütteln und die wässrige Lösung mit Aceton im Überschuß zu behandeln. Der dann entstehende minimale Niederschlag ist in der Pufferlösung wasserklar löslich und entfaltet lytische Wirksamkeit.

Tabelle II.

Lytische Werte nach der beschriebenen Reinigung und Lösung in p_H 7,7.
Vornahme des Versuchs bei p_H 6,9 bis 7,1.

Organ	Abnahme in absoluten Zahlen in 24 Stunden	Abnahme in %
Milz	217— 56	— 74
"	332—171	— 49
"	280—169	— 39
Lymphdrüsen	189—117	— 38
"	335—177	— 44
"	205— 78	— 62
"	254—137	— 47
"	128— 24	— 81
Thymus	186— 99	— 47

Die Lösungen sind eiweißfrei, sie zeigen keine tryptischen oder lipolytischen fermentativen Eigenschaften.

Die lytische Substanz muß bereits in minimalen Quantitäten wirksam sein; es läßt sich nämlich, wenn das Acetonpulver nach erfolgter Alkoholreinigung ungefähr bis auf die Hälfte reduziert worden ist, nach dem Schütteln mit der Pufferlösung und Wägung auf getrocknetem und gewogenem Filter eine Gewichtsabnahme feststellen, die nur Milligramme oder Bruchteile davon beträgt. Wir können infolgedessen nicht sagen, daß wir mit dieser Darstellungsweise unser Ziel schon erreicht haben. Auch über die Zusammensetzung der Substanz kann man irgend etwas Positives nicht aussagen, bevor die Reinigung noch weiter fortgeschritten ist. Die Untersuchungen werden mit möglichst großen Quantitäten fortgesetzt.

Jedenfalls geht aus unseren Versuchsergebnissen hervor, daß sie mit den früheren Angaben von *Freund* und *Kaminer*, *Dustin*, u. a. übereinstimmen. Es ist uns unverständlich, wie *Freund* und *Kaminer* als lytische Stoffe später Substanzen angeben können, die diese erwähnten Löslichkeitseigenschaften nicht besitzen.

2. Einfluß des Säuregrades auf die Cytolyse.

Wir haben jetzt darzulegen, warum es unbedingt notwendig ist, die Lösung der lytischen Substanz ausschließlich in gepufferten Salzlösungen vorzunehmen. Damit erledigen wir zugleich Punkt 2 unserer Einleitung, nämlich den Einfluß des p_H auf den lytischen Prozeß. Dies ist besonders wichtig, da wir jetzt — im Gegensatz zu unserer ersten Mitteilung — mit wässrigen Extrakten und nicht mit schon von selbst gut gepufferten Flüssigkeiten, wie Seren und Organextrakten arbeiten.

Wir haben bereits angedeutet, daß die Lysis der Tumorzellen vom p_H des Milieus sehr abhängig ist. Auch hier zeigen sich noch in-

dividuelle Differenzen. Im allgemeinen sind die Zellen von spontanen, menschlichen Carcinomen noch viel empfindlicher als unsere gewöhnlichen transplantierten Tumoren.

Als allgemeine Regel gilt, daß saure Reaktion der Lysis entgegenarbeitet, alkalische sie fördert. Wir verstehen jetzt, weshalb die *Freund*-sche Waschflüssigkeit so sauer ist (p_H 5,4). Es ergibt sich, daß Tumorzellen sich in diesem Milieu wochenlang ausgezeichnet halten und bei diesem p_H sich sogar bedeutend vermehren können, während sie bei der *Reaktion des Blutes oder des Serums* (7,3 bis 7,6) bald zugrunde gehen. Diese Tatsache ist für die Züchtung von Tumorzellen in vitro von größter Bedeutung. Man hat die verschiedensten Kulturflüssigkeiten angewandt, aber diesen doch immer ein p_H von $\pm 7,3$ gegeben. Vielleicht ist dies die Ursache, daß bis in jüngster Zeit niemals eine einwandfreie Kultur von Carcinomzellen regelmäßig gelungen ist.

Wir haben nach den Bedingungen gesucht, unter denen diese Erhaltung der Tumorzellen in vitro noch weiter getrieben werden kann. Jedenfalls spielt das p_H eine bedeutende Rolle. Interessanterweise haben auch neuere Untersuchungen (*Harde, Rous*, u. a.) ergeben, daß die intrazelluläre Reaktion von Tumorzellen eine stark saure ist (5,8 bis 6,4), viel saurer als die des umspülenden Blutes.

In dieser Beziehung liegt auch der Gedanke nahe, daß die bedeutenden glykolytischen Spaltungen der Tumorzellen schon infolge der dabei frei werdenden Säuremengen der Lysis entgegenarbeiten.

Tabelle III gibt Belege für den Einfluß der p_H -Wirkung auf die Lysis.

Tabelle III.

Beispiele für den Einfluß der Reaktion des Milieus auf die Cytolyse von Krebszellen (*Twort*), siehe I. Mitteilung.

p_H	Vermehrung in % nach 24 Stunden	Vermehrung in % nach 48 Stunden
5,4	+ 60	—
	+ 38	—
	+ 16	+ 13
	+ 7	+ 4
6,8	+ 18	—
	+ 21	—
	+ 3	—
7,1	— 6	—
	+ 3	—
	+ 12	—
	— 15	—
	+ 21	—
7,8	— 14	—
	— 40	— 72
	— 8	—

Es ist offensichtlich, daß man, wenn Fehler bei der Bestimmung von lytischen Wirkungen vermieden werden sollen, bei einem genau festgestellten p_H arbeiten muß.

Als solches haben wir das p_H von 7,1 angenommen, das aus der Mischung von 1 Teil *Freundscher* Lösung (Tumorsuspension) und 10 Teilen lytischer Lösung (p_H 7,7) entsteht.

Es ist uns selbstverständlich infolge unserer noch unzureichenden Kenntnisse nicht möglich, bereits irgendwelche Angaben über die chemische Zusammensetzung der lytischen Substanz zu machen.

Die ganze Darstellungsweise (Adsorption an Niederschlägen), die Eluierbarkeit mit Phosphatlösung, die Abhängigkeit der Wirkung vom p_H , läßt aber doch Beziehungen zu einem (autolytischen) Ferment-system vermuten, und damit nähert sich die ganze Auffassung des cytolytischen Problems wieder der ursprünglichen Konzeption *Neubergs*.

Es war daher von Interesse, festzustellen, wie sich diese künstlich hergestellten lytischen Lösungen bei der Bestrahlung verhielten.

3. Strahlenwirkung.

Wie in der ersten Mitteilung beschrieben, wurden auch die hergestellten Lösungen unfiltrierten Bestrahlungen verschiedener Zeitdauer ausgesetzt und die lytische Wirksamkeit, immer auf dieselbe Zellensuspension bezogen, untersucht.

Soweit wir bis jetzt die Resultate überblicken können, treten in der Tat in diesen künstlichen Extrakten dieselben Wirkungsschwan-

Tabelle IV.

Einfluß von Röntgenstrahlen auf die lytische Wirksamkeit von lytischen Lösungen (180 kV, 2 Milliamp., 25 cm Abstand).

	Abnahme der Zellen in abso- luten Zahlen	Abnahme der Zellen in %
Nach 0h	128—24	— 81
" 1	106—41	— 61
" 2	128—69	— 46
" 4	166—62	— 62
Unbestrahlte Kontrolle derselben Zellen in <i>Freundscher</i> Lösung + Serum 1/50	203—326	+ 60
Nach 0'	223—187	— 12
" 5	413—311	— 24
" 15	332—357	+ 7
" 1h	312—302	— 3
" 2	342—296	— 13
" 4	302—238	— 23
" 6	338—269	— 20

kungen auf, denen wir im Serum oder in Organextrakten begegnet sind. Es zeigen sich auch hier die gleichen diskontinuierlichen Einwirkungen. Ein kräftig wirksames Präparat wird durch die Bestrahlung meist nach einem variablen Intervall geschwächt, bei weiterer Bestrahlung kehrt die Aktivität, wenigstens teilweise, zurück. In der ersten Bestrahlungsperiode kann sich auch, namentlich bei einem weniger aktiven Präparat, eine Steigerung des lytischen Vermögens zeigen, die bald auch wiederum von einer Depression gefolgt wird. *Tabelle IV* gibt zwei diesbezügliche Beispiele. Diese der Röntgenstrahlung analoge Reaktion erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß es uns gelungen ist, die lytische Substanz, wenn auch vorläufig in unreiner Form, zu isolieren. Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Zusammenfassung.

1. Es gelingt, die lytische Substanz aus Organen zu isolieren. Die Organe des reticulo-endothelialen Apparates liefern dabei die größte Ausbeute. (Lymphdrüsen usw.).
2. Eine weitere erforderliche Reinigung wird nur bei Darstellung in großem Maßstabe möglich sein.
3. Die chemische Zusammensetzung der Substanz ist bis jetzt noch nicht ermittelt.
4. Der lytische Versuch soll bei einem bestimmten p_H vorgenommen werden.
5. Die H-Ionenkonzentration ist ein wichtiger Faktor bei diesem Prozeß.
6. Die Substanz ist strahlenempfindlich.

Kationen und parasymphathische Gifte.

Ein Beitrag zur Frage der Zondekschen Theorie.

Von

L. Jendrassik und L. Antal.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Pécs und dem physiologischen Institut der Universität Budapest, Ungarn.)

(Ausgeführt mit Unterstützung der k. ung. staatlichen Stiftung zur Förderung der Naturwissenschaften.)

(Eingegangen am 28. Juni 1927.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

In den letzten Jahren hat das Interesse gegenüber den Ionenwirkungen einen bedeutenden Aufschwung genommen. Das Ziel der Forschung ist nicht mehr eine bloße Beschreibung der Tatsachen, sondern die Aufklärung feinerer Mechanismen physiologischer, pathologischer und pharmakologischer Vorgänge. Zu diesem Zwecke werden die Ionenwirkungen in ihrem Zusammenhange mit Nerven-erregung, Hormon- und Giftwirkungen vielfacherweise untersucht, anderseits die Änderungen am Elektrolytgehalt der Organe und Körperflüssigkeiten mit Hilfe mikrochemischer Bestimmungsverfahren verfolgt.

In der untenstehenden Arbeit haben wir den Zusammenhang zwischen Kalium (bzw. anderen Kationen) und Parasympathicus an einem isolierten Warmblüterorgan untersucht, mit der Absicht, auf diese Weise die Richtigkeit einer Theorie prüfen zu können, welche in der Literatur der letzten Jahre vielfach zitiert wurde und auf die Forschung sehr anregend wirkte.

Von *S. G. Zondek* stammt die Theorie, welche die Wirkung vegetativer Nerven auf den Einfluß von Ionen zurückführt. Auf Grund gewisser Erscheinungen — welche nachfolgend öfters erwähnt werden sollen — folgerte er, daß die Wirkung des Parasympathicus durch eine lokale Anreicherung an Kalium, die Wirkung des Sympathicus durch eine lokale Anreicherung an Calcium zustande kommt (1) (2) (3).

Auch eine pharmakologische Reizung hat nach ihm denselben Mechanismus. Die Gifte der Pilocarpingruppe (Cholin, Acetylcholin,

Muscarin, Physostigmin) wirken auch durch Kaliumkonzentrierung, Adrenalin durch Calciumkonzentrierung. Die Erklärung dieser Ähnlichkeit der Nerven- und Giftwirkung erblickt *Zondek* in den Resultaten *O. Loewis* (4), nach dessen Versuchen die Wirkung vegetativer Nerven eigentlich auch auf pharmakologischem Wege, durch Produktion spezifisch wirksamer Gifte, erfolgt.

Wir betrachten nun einen Teil der Theorie (parasymphathische Gifte und Kalium) und suchen, ob in den literarischen Angaben und eigenen Versuchsergebnissen sich hinreichende Beweise für die interessante und wichtige Hypothese *Zondeks* finden lassen. Die Zusammenhänge zwischen Kalium und Parasympathicus sind viererlei Art:

1. Nach den Angaben einiger Autoren ist die Wirkung der Vagusgifte verschieden, je nach dem Gehalt der Blutersatzflüssigkeiten an Kationen.

2. Wirken diese Gifte auf verschiedene Organe, so findet man oft Unterschiede in der Umspüllüssigkeit, besonders in deren Kaliumgehalt. Ähnliche Verschiebungen der Zusammensetzung sind nach elektrischer Reizung parasymphathischer Nerven beschrieben.

3. Werden Organe durch Mangel an Kalium gelähmt, so kann ihre Tätigkeit auf Einwirkung parasymphathisch erregender Einflüsse wieder hergestellt werden.

4. Es zeigt sich (besonders in den Untersuchungen *Zondeks*) eine auffallende Übereinstimmung in der Wirkungsrichtung von Kalium und Parasympathicus. Wo Pilocarpin, Cholin oder elektrische Vagusreizung erregend wirken, verhält sich auch Kalium erregend, und lähmt, wo diese auch lähmen.

Wir möchten nun diese Zusammenhänge einzeln etwas näher betrachten, unsere Bemerkungen, ebenso unsere experimentellen Erfahrungen anführen. Wir glauben nämlich, daß die Erscheinungen nicht eindeutig zugunsten der Theorie sprechen, und eben in dem wichtigsten (vierten) Punkte erheben sich gegenüber *Zondeks* Auffassung ernste Schwierigkeiten.

1. Die Abhängigkeit der chemischen Parasympathicusreizung von Kationen.

Würde die Wirkung der parasymphathicomimetischen Gifte darin bestehen, daß sie das Kalium von der Umspüllösung zu gewissen Teilen der Zelle befördern, so wäre zu ihrer Wirkung das Vorhandensein von Kalium außer der Zelle nötig. Ist in der Außenflüssigkeit Kalium gar nicht vorhanden, so darf daher die Wirkung nicht zustandekommen. Bei erhöhtem Kaliumgehalt wäre dagegen eine verstärkte Wirkung dieser Gifte zu erwarten.

Die am überlebenden Darm erhaltenen Ergebnisse scheinen im ersten Augenblick in diese Richtung zu zeigen. Hält man nämlich ein *Magnus-*

sches Präparat längere Zeit in kaliumfreier Tyrodelösung, so erlischt seine Empfindlichkeit gegenüber den Pilocarpingiften. Wir untersuchten daher etwas näher die Frage, ob dieser Umstand eine Stütze für die *Zondeksche* Theorie bilden könnte. Die untenstehenden Versuche beweisen aber, daß dies nicht der Fall ist, und aus diesen Erscheinungen dürfen wir noch nicht auf einen spezifischen Zusammenhang zwischen Pilocarpinwirkung und Kaliumwirkung schließen.

Die Versuche bestanden darin, daß wir die Empfindlichkeit des Darmstückchens gegenüber diesen Giften bei verschiedenem Gehalt an Kalium und Calcium bestimmten. Wo sich ein Unterschied zeigte, wurde auch die Wirkung eines unmittelbar wirkenden Giftes, des Bariums, untersucht.

Die Versuchsanordnung war auch im übrigen dieselbe, die wir gelegentlich früherer Arbeiten verwendet haben. Das Darmpräparat (nach *Magnus*) befand sich in einer Tyrodelösung ohne Mg und Phosphat. Zuerst wurde die Empfindlichkeit des Präparats gegenüber dem Gift (z. B. Pilocarpin) ermittelt, indem durch eine geeignete Gabe (0,005 bis 0,1 mg Pilocarpin-HCl für 75 ccm Tyrodelösung) eine mittelstarke Kontraktur herbeigeführt wurde [vgl. *Neukirch* (5), *Storm van Leeuwen* (6)]. Das Gift wirkt dabei 2 bzw. 3 Minuten lang auf das Organ ein, nachher wird es durch wiederholtes Auswaschen mit frischer Tyrodelösung (in der dritten und fünften bis siebenten Minute) vom Gift befreit. Nach 10 Minuten wird der Versuch wiederholt. Der Pilocarpinversuch muß mehrmals ausgeführt werden, weil im Anfang die Empfindlichkeit schwankend ist. Meistens erhöht sich bei den ersten Prüfungen die Empfindlichkeit, also die Kontrakturhöhe. Wurde die erhaltene Kontraktur bei der dritten oder vierten Gelegenheit konstant, so gingen wir zur veränderten Tyrodelösung über.

Es ergab sich in diesen Versuchen folgendes: Bei Kaliummangel (Tyrode mit ein Viertel Kalium = 0,005 % KCl) sind die erhaltenen Pilocarpinwirkungen beträchtliche Zeit (auch nach 5 bis 20 Minuten) gleich, wie in normaler Tyrodelösung (s. Abb. 1). Während dieser Periode sind aber auch

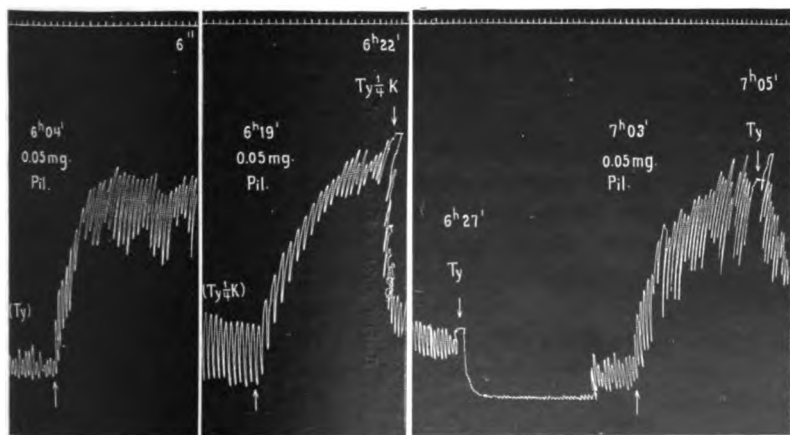


Abb. 1. Kaninchendünndarm.

Pilocarpin-HCl wirkt bei $\frac{1}{4}$ Kalium gleich stark erregend wie in normaler Tyrodelösung. Steigerung der Kaliumkonzentration von $\frac{1}{4}$ aus (Rückkehr zur normalen Lösung = Ty) wirkt hemmend, also in entgegengesetzter Richtung.

die Darmbewegungen ganz normal, zum Zeichen, daß die Motilität noch nicht gelitten hat. Oft verhält sich der Darm in kaliumfreier Lösung ebenso.

Die Erklärung hierfür ist, daß aus dem Innern der Zellen beträchtliche Kaliummengen in die Außenflüssigkeit diffundieren können, so daß die Lösung kaliumhaltig wird. Auch diese kleine Kaliumkonzentration ist in diesen Fällen zur normalen Tätigkeit genügend [vgl. Jannink (7)].

Weilt der Darm längere Zeit in kaliumfreier Lösung, so leiden — wie bekannt — die Spontanbewegungen, und zuletzt erlischt oft die Automatie fast ganz. In diesem Stadium finden wir dann auch die Wirkung des Pilocarpins herabgesetzt oder ganz erloschen. Ähnliches gilt auch für Cholin, Acetylcholin. Hat aber die Wirksamkeit der Pilocarpingifte abgenommen, so wirkt auch Barium minder stark. Die Empfindlichkeit gegenüber Bariumchlorid wurde ebenso festgestellt, wie oben beschrieben, zuerst in normaler Tyrodelösung, dann in kaliumfreier. Hierbei ergibt sich, daß Gaben, welche in normaler Lösung starke Kontraktionen erzeugten, in kaliumfreier Lösung fast gar nicht oder auch gar nicht wirken. Es sei erwähnt, daß die Empfindlichkeit gegenüber Pilocarpin etwas früher abnimmt als gegenüber Barium. Dies scheint aber für unsere Schlußfolgerung unwesentlich zu sein. Wir müssen ja mit der Möglichkeit rechnen, daß Barium als ein Ion in bestimmtem Grade die üblen Folgen des Kaliummangels mildern, den Ca- und Na-

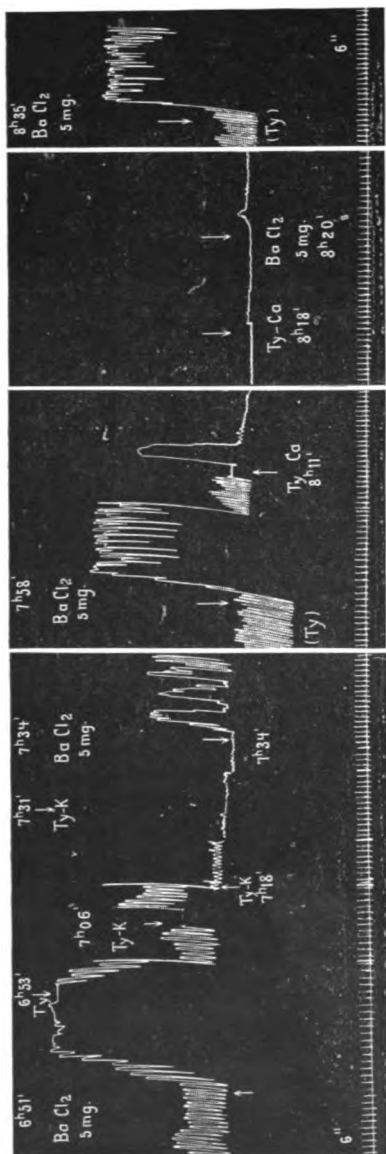


Abb. 2. Kaninchendünndarm.
Barium wirkt in kaliumfreier Tyrodelösung (Ty-K) schwächer als in normaler Lösung. Noch schwächer ist die Wirkung in Tyrode ohne Calcium (Ty-Ca).

Überschuß antagonisieren und so für seine eigene Kontrakturwirkung die Vorbedingungen bessern könnte. Ist die Pilocarpinwirkung aber verschwunden, so ist die Bariumwirkung auch nur höchstens angedeutet vorhanden.

Diese Versuche zeigen daher, daß der *Kaliummangel nicht nur die „Vagusreizung“ hemmt, sondern auch die Bariumwirkung*. Dies spricht dafür, daß in solchen Fällen parallel mit dem Automatismus auch die Kontrakturfähigkeit leidet. Kalium ist daher nicht nur zur Wirkung der Pilocarpingifte, sondern für die Funktion und Reizbarkeit der glatten Muskelzellen im allgemeinen nötig.

Gegen die Verwertbarkeit dieser Erscheinungen zugunsten der Ionen-theorie spricht auch der Umstand, daß auch *Calciummangel die Pilocarpinwirkung aufhebt*, und zwar schon in viel kürzerer Zeit als die kaliumfreie Lösung. Hier geht die Abnahme der Pilocarpin- und Cholinempfindlichkeit auch mit der Abnahme der Bariumempfindlichkeit und Motilität parallel. Wirkt das Pilocarpin im Sinne der Theorie *Zondeks* durch Anreicherung von Kalium, so ist das Calcium in der Außenlösung für die Reizung selber gar nicht nötig. Die Unwirksamkeit muß daher einen anderen Grund haben. *Zondek*, der selber diesen Versuch anstellte, erklärte die Unwirksamkeit bei Ca-Mangel auch mit dem Schwund der Kontrakturfähigkeit (1). Wirkt aber Calciummangel in dieser Weise, so ist dies eine weitere Stütze dafür, daß auch Kaliummangel die Entwicklung von Kontrakturen derart zu hindern imstande sein könnte.

In calciumfreier Tyrodelösung bleibt auch die Kaliumkontraktur aus. Eine Steigerung des Kaliumgehalts auf das Drei- bis Sechsfache ruft in normaler Lösung auch maximale Kontrakturen hervor, unter solchen Umständen keine. *Zondek* faßt auch diesen Umstand als einen Beweis seiner Theorie auf, indem auch hier parasymphathische Gifte und Kalium sich gleichsinnig verhalten. Nach dem oben Gesagten ist dies aber keine ernste Stütze der Theorie, da der Darm nicht nur für Kalium und parasymphathische Gifte unempfindlich ist.

Noch weniger beweisend ist ein anderer Versuch *Zondeks*, in welchem er die Unempfindlichkeit des Meerschweinendarms bei Na- und K-Mangel gegenüber Pilocarpin feststellt. Hierbei werden sowohl KCl wie NaCl aus der Nährlösung weggelassen und der osmotische Druck durch eine isosmotische Menge von Glucose aufrecht erhalten. Der Mangel von Na ist aber für die Motilität des Darms noch mehr schädlich wie von K (ähnlich wie am quergestreiften Muskel). Außerdem wirkt eine solche Glucosekonzentration selbst stark hemmend [vgl. (16)].

In Lösungen mit dreifachem Kaliumgehalt (0,06% KCl) oder mit 3 Ca (0,06% CaCl₂), ebenso bei 3 Mg (0,03% MgCl₂), ist die Pilocarpinwirkung gleich stark, wie in normaler Tyrodelösung, oder nur unbedeutend bzw. unregelmäßig verschieden.

Auf Grund dieser Erscheinungen glauben wir schließen zu dürfen, daß der *Einfluß des Kaliumgehalts auf die Pilocarpinwirkung nichts Wesentliches zugunsten der Zondekschen Theorie aussagt*.

2. Änderungen im Elektrolytgehalt bei der Reizung vegetativer Nerven.

Howell beobachtete als erster im Jahre 1908 eine Anreicherung von Kalium in der Lockelösung bei Durchströmung des Warmblüterherzens, dessen Vagus gereizt wurde. Er zog hieraus den Schluß, daß das Kalium im Mechanismus der Vaguswirkung eine Rolle spielen könnte. In der letzten Zeit vermehrten sich ähnliche Befunde in der Literatur. Ohne alle diese

hier aufzählen zu wollen, verweisen wir nur auf einige, die an *isolierten Organen* ermittelt wurden. *Bouckaert* (9), *Asher* (10) postulierten einen Austritt von Kalium im Froschherzen bei Vagusreizung. Durch *Scheinfinkel* (11) wurde sodann (im *Asherschen* Institut) das Kalium auch chemisch nachgewiesen. *Yasutake* (12) zeigte am Krötenherzen, daß bei elektrischer Reizung des isolierten Sympathicus ein analoger Austritt von Calcium sich nachweisen läßt. *E. Wollheim* (13) fand bei Vagusreizung (neben durchtrenntem Splanchnicus) eine Verminderung des K/Ca-Quotienten im Pfortaderblute, bei Splanchnicusreizung das Gegenteil¹. *Dresel* und *Wollheim* (14) machten sodann die Beobachtung, daß bei der Adrenalinwirkung von der Außenlösung Calcium in den überlebenden Darm wandert. Hierher gehören auch die Befunde der *Höberschen* Schule, daß quergestreifte Muskeln, deren vegetative Beeinflussung bekanntlich vielerleiweise bewiesen wurde, auf Einwirkung parasympathisch erregender Gifte Kalium von außen aufnehmen und auf Adrenalin und Atropin abgeben (15).

Diese Befunde scheinen auch in dem ersten Augenblick für die Theorie wichtige Beweise zu liefern, da sie eben die hypothetische Elektrolytverschiebungen anzeigen. Betrachten wir aber die Erscheinungen aus dem Gesichtspunkt der *Zondekschen* Theorie etwas näher, so ergeben sich alsbald manche Unstimmigkeiten. Wir möchten bei dieser Gelegenheit nur auf zwei Momente aufmerksam machen.

1. Die Richtung der Ionenaufnahme und -abgabe ist bei den verschiedenen Organen eine recht ungleiche. Am Herzen wird bei Parasympathicusreizung Kalium in die Umspüllösung abgegeben, bei dem quergestreiften Muskel dagegen aufgenommen. Auch in den Versuchen *Wollheims* zeigt sich (am Darm) eine relative Verminderung des Kaliums, was also auch einer Aufnahme in die Zellen entspricht. Am Herzen wird das Calcium bei Sympathicusreizung abgegeben, am Darm aufgenommen. Besteht die Nervenwirkung in der Anreicherung dieser Ionen, so würde man glauben, daß die Änderungen in der Umgebung immer gleichsinnige sein müssen. Sollte aber eine Vermehrung oder Abnahme erfolgen? Welche Befunde sprechen für und welche gegen die Theorie?

2. Die zweite Schwierigkeit besteht eben darin, daß man dies aus bekannten Tatsachen nicht ableiten kann.

Würde die Parasympathicusreizung in einer lokalen Kaliumkonzentrierung bestehen, so könnte dies auf dreierlei Weise erfolgen:

a) Das Kalium wird einfach aus der umspülenden Lösung aufgenommen. Auf diese Weise wäre eine Abnahme der absoluten Kaliumkonzentration in der Außenlösung zu erwarten (z. B. *Okamoto*). Bei einem analogen Wirkungsmechanismus des Sympathicus sollte der

¹ Am anderen Orte haben wir bereits darauf aufmerksam gemacht, daß die Ionenverschiebungen die Wirkung der Nerven am Darm nicht erklären können und somit keine Beweise für die *Zondeksche* Theorie bilden [vgl. (4)].

Calciumgehalt abnehmen (wie dies in den Versuchen von *Dresel* und *Wollheim* der Fall ist).

b) Die Ionenkonzentrierung kommt an Stelle der Wirkung dadurch zustande, daß die entsprechenden Ionen von einem Reservedepot in die Spülflüssigkeit abgegeben werden und durch den erhöhten Ionengehalt der Lösung (also von der Lösung aus) am Wirkungsort die Funktion beeinflussen. Hierbei wäre bei Parasympathicusreizung eine Kaliumzunahme, bei Sympathicusreizung eine Calciumzunahme in der Lösung zu erwarten, wie dies in den Herzversuchen auch gefunden wird.

c) Es wäre aber auch anzunehmen, daß die Mobilisierung der K- und Ca-Ionen nicht nur in die Lösung erfolgen kann, sondern diese vom Depot unmittelbar zum Wirkungsort befördert werden. Bei diesem Mechanismus wäre ein Zuwachs des Gehalts in der Lösung nur dadurch möglich, daß die Verschiebung der Ionen nicht genau gelingt und ein Teil nebenbei in die umgebende Flüssigkeit gerät. *Scheinfinkel* neigt zu einer solchen Auffassung und erklärt hierdurch, daß ein Kaliumaustritt nur bei kaliumfreier Lösung gut nachweisbar ist.

Aus alledem möchten wir vorderhand nur den Schluß ziehen, daß *diese Erscheinungen* bei der heutigen Lage unserer Kenntnisse *noch keine sichere Basis für die Ionentheorie der vegetativen Reizung bilden können*. Einer von uns trachtet auch auf diesem Wege diesen Fragen näher zu kommen, und sucht vor allem zu entscheiden, ob die beobachteten Änderungen wirklich mit der Nervenreizung bzw. dem spezifischen Wirkungsmechanismus der Giftwirkung in Verbindung stehen oder aber die Konzentrationsänderungen nur Folgen der Funktionsänderung der Muskelfasern sind. In den zitierten Versuchen blieb diese Frage noch unentschieden.

3. Die Wiederherstellung der Funktion bei Kaliummangel durch Vagusreizung.

J. Bouckaert machte die Beobachtung (1921), daß ein Frosherz, nachdem es in kaliumfreier Ringerlösung seine Tätigkeit einstellte, nach Einwirkung von Pilocarpin wieder zu schlagen beginnt (9). *L. Asher* bestätigte dies für faradische Vagusreizung (10). Beide Autoren deuteten die Erscheinung dahin, daß bei Vagusreizung Kalium in die Herzhöhle diffundiert, die Lösung also kaliumhaltig wird. Die wahrscheinlichste Erklärung dieser Befunde ist daher in dem oben Gesagten gegeben.

4. Parallelität von Kalium- und Parasympathicuswirkung.

Den Ausgangspunkt und die stärkste Stütze bei der Aufstellung seiner Theorie bildete für *Zondek* der Umstand, daß an den verschiedensten Organen die Wirkung des Kaliums mit der Parasympathicuswirkung, die des Calciums mit der Sympathicuswirkung immer gleichgerichtet

erscheinen. Die Theorie verlangt auch eine qualitativ vollständige Übereinstimmung. Ist der Parasympathicusreiz letzten Endes eine Kaliumanreicherung, so darf die Wirkung der Kaliumsteigerung gegenüber dem Parasympathicuseffekt keinen Unterschied zeigen.

Die bereits oben beschriebenen Versuche enthalten aber einen Fall, wo Kalium- und Parasympathicuswirkung einander nicht gleichen. Bei vermindertem Kaliumgehalt wirken nämlich die Gifte der Pilocarpingruppe immer sofort *erregend*, während in einer derartigen Umgebung die Steigerung des Kaliumgehalts eben *entgegengesetzt* ist als unter normalen Umständen.

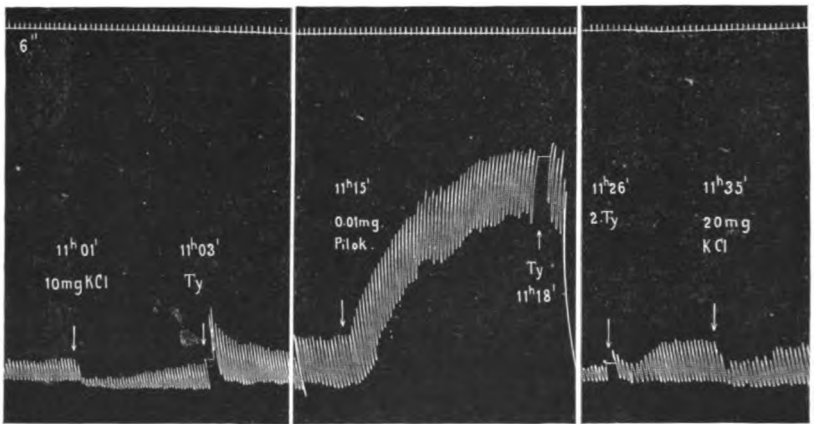


Abb 3. Dünndarm eines 3,9 kg schweren Kaninchens.

Steigerung der Kaliumkonzentration oberhalb des normalen Wertes wirkt lähmend, Pilocarpin sofort erregend, also in entgegengesetztem Sinne.

Hält man den Darm in kaliumarmer oder kaliumfreier Tyrodelösung, so ruft die Steigerung des Kaliumgehalts eine vorübergehende Lähmung der Bewegungen hervor. Diese Erscheinung war schon *Jannink* (7) und *Rosenmann* (17) bekannt. Einer von uns wies darauf hin, daß diese vorübergehenden Wirkungen als „Potentialwirkungen“ zu betrachten sind, den Giftwirkungen von *W. Straub* ähnlich (18) (19). Sehr auffallend ist die Lähmung und viele Minuten dauernd, wenn man in einer kaliumfreien Lösung den Kaligehalt plötzlich auf die gebräuchliche „normale“ 0,02%ige KCl steigert. Auch nach halbiertem Kaliumgehalt wirkt die normale Tyrodelösung hemmend, nur in geringerem Grade. An den meisten Darmstücken erhält man sogar, von normalen (0,02%igen KCl-)Gehalt ausgehend, bei mäßiger Steigerung erst eine hemmende Wirkung, und nur ein weiteres Steigern ergibt Kontraktur (s. Abb. 3).

In diesen Erscheinungen sehen wir eine beträchtliche Schwierigkeit für die *Zondeksche* Theorie. Würden die Gifte der Pilocarpingruppe

durch eine lokale Anreicherung von Kalium wirken, so dürfte die Steigerung des Kaliumgehalts (wo durch Ausgleich das Kalium auch am Wirkungsort vermehrt wird) nie anders wirken, wie diese Gifte. Gegen die Beweiskraft dieser Versuche kann man nicht den Einwand machen, daß der Kaliummangel das Präparat stark verändert, so daß hierdurch auch der Mechanismus der Giftwirkung ganz anders wird. Dies ist schon darum sehr unwahrscheinlich, weil in kaliumarmer Lösung die Wirkung der parasymphathischen Gifte — wie erwähnt — lange Zeit sich auch *quantitativ* nicht ändert. Wäre das Präparat so tiefgreifend umgestimmt, daß der Wirkungsmechanismus des Giftes ein völlig anderer würde, so müßte sich wenigstens die Wirkungsstärke in bestimmtem Grade geändert haben. Außerdem aber ist die Wirkung einer mäßigen Kaliumsteigerung — wie erwähnt — oft auch bei annähernd normalem oder *normalem Kaliumgehalt* eine hemmende, also auch unter optimalen Verhältnissen der Pilocarpinwirkung entgegengesetzt.

Es ist noch zu fragen, ob vielleicht eine *relative Kaliumzunahme* die Pilocarpinwirkung erklären könnte. Zondek führte zwar als Beweis Versuche an, in welchen er den absoluten Kaligehalt änderte. Bei der Beschreibung der Theorie erwähnt er aber eine relative Kaliumvermehrung. Dies geschieht offensichtlich in der Meinung (was übrigens ziemlich verbreitet ist), daß die Wirkung der absoluten Vermehrung eines Ions mit der Wirkung der relativen Vermehrung immer gleichbedeutend ist. Diese Auffassung widerspricht aber vielen Tatsachen. Für antagonistische Ionenpaare ist sie sicher nicht richtig [vgl. (16) ebenso F. B. Hoffmann (20)]. Wie es einer von uns nachgewiesen hat, wirkt am Darm eine absolute Senkung des Kaliumgehalts erregend, also völlig entgegengesetzt als eine gleichsinnige Zunahme des K/Ca-Quotienten, hervorgerufen durch Steigerung der Calciumkonzentration, was immer nur Hemmung ergibt.

Wir glauben also, daß das zur Verfügung stehende Versuchsmaterial eine sehr schwache Grundlage bildet, um die Pilocarpinwirkung mit Hilfe von Konzentrationsänderungen des Kaliums zu erklären. Dies besagt aber noch nicht, daß dies auch gar nicht möglich wäre.

Wir stellten also auch hierüber Versuche an, wobei wir auch das *Natrium* berücksichtigt haben. Das Na könnte als Synergist des Kaliums im Wirkungsmechanismus wohl auch teilnehmen, wie dies bereits Zondek ausgedrückt hatte. Eine relative Vermehrung des Verhältnisses (Na — K) : Ca kann durch Zunahme des Natriums oder Kaliums oder Abnahme des Calciums erfolgen, außerdem ist auch die Kombination beider Möglichkeiten denkbar.

Eine *Natriumkonzentrierung für sich allein* ist für die Erklärung wohl nicht annehmbar. Das Steigern der Natriumkonzentration (mit 10 bis 15 %)

in der Tyrodelösung führt zwar zu einer kleinen vorübergehenden Kontraktur des Darmes, es ist aber nicht streng beweisbar, daß die Wirkung hier wirklich vom Natrium und nicht von den Chlorionen oder einfach vom Steigern des osmotischen Druckes herrührt. Noch größer ist die Wahrscheinlichkeit des Mitspielens des osmotischen Druckes bei noch höheren NaCl-Gaben. Außerdem ist aber schon an und für sich nicht wahrscheinlich, daß die Wirkung der Vagusreizung eben durch das am wenigsten wirksame Agens zustandekommen sollte. Gegen die Annahme einer alleinigen Natriumkonzentrierung spricht aber in gewissem Grade auch der folgende Versuch:

Halten wir den Darm in einer Lösung, welche nur den $\frac{3}{4}$ -Teil der üblichen [NaCl] enthält, und das weggelassene NaCl mit einer isomotischen Carbamidkonzentration oder Glykokoll ersetzt ist, so leidet hierdurch die Pilocarpinwirkung nicht, die Kontrakturen sind wie in normaler Lösung. Steigert man aber den NaCl-Gehalt auf den üblichen Wert, so erfolgt eine vorübergehende Erregung, welche jedoch durch das Auswaschen des Carbamids bzw. Glykokolls bedingt ist.

Verabreichen wir nämlich dem Darm (in normaler Tyrodelösung) ebensoviel dieser Stoffe wie in dem vorangehenden Versuch, so wirken sie hemmend auf die Darmbewegungen, und beim Auswaschen erfolgt eine genau so starke Kontraktur. Die Steigerung des Na-Gehalts von 75% bis auf den normalen Wert wirkt also nicht so stark auf den Darm, daß dies unter den beschriebenen Bedingungen sichtbar wäre.

Es sei noch hinzugefügt, daß an vielen Darmpräparaten die Steigerung der [NaCl] (vom normalen Gehalt ausgehend) hemmt.

Könnte man die Parasympathicusreizung durch eine *Calciumabnahme*, also eine hierdurch hervorgebrachte *relative Kaliumzunahme* erklären? Diese Erklärung findet eine Stütze in der Beobachtung, daß beim Herabsetzen der CaCl_2 -Konzentration der Tyrodelösung eine starke Kontraktur erzielt werden kann (19). Diese ist manchmal auch maximal stark, jedoch vorübergehend („Potential“-Wirkung). Qualitativ wirkt also die Calciumabnahme wie die fragliche Pharmaca. Es ist aber nicht schwer, zu zeigen, daß auch eine solche Erklärung unzulänglich ist:

1. Einen Wink hierzu müssen wir schon darin erblicken, daß man durch geeignet starke Gaben der Pilocarpingifte auch anhaltende, maximal starke Kontrakturen hervorrufen kann, während die Wirkung der Calciumabnahme nicht so anhaltend („manent“) ist.

2. Ein weiterer Unterschied zwischen dieser „Diminutionswirkung“ des Calciums [vgl. (19)], und Pilocarpinwirkung besteht darin, daß in Anwesenheit von 0.03% MgCl_2 in der Lösung, wenn erstere ausbleibt, die Pilocarpinwirkung trotzdem ungehindert zustande kommt (s. Abb. 4).

3. Hält man den Darm in einer calciumarmen Lösung ($\frac{1}{8}$ Teil des üblichen 0.02%igen CaCl_2 -Gehalts), so ist die Motilität noch erhalten, die Bewegungsamplituden oft sogar gesteigert, nur die Frequenz ist vermindert. Die Pilocarpinwirkung ist darin nicht kleiner als in normaler Lösung. Vermindern wir aber das Calcium noch weiter,

indem wir calciumfreie Flüssigkeit reichen, so erhalten wir keine Diminutionskontraktur oder nur eine schwache und sehr flüchtige Wirkung, die Automatie verschwindet aber ganz.

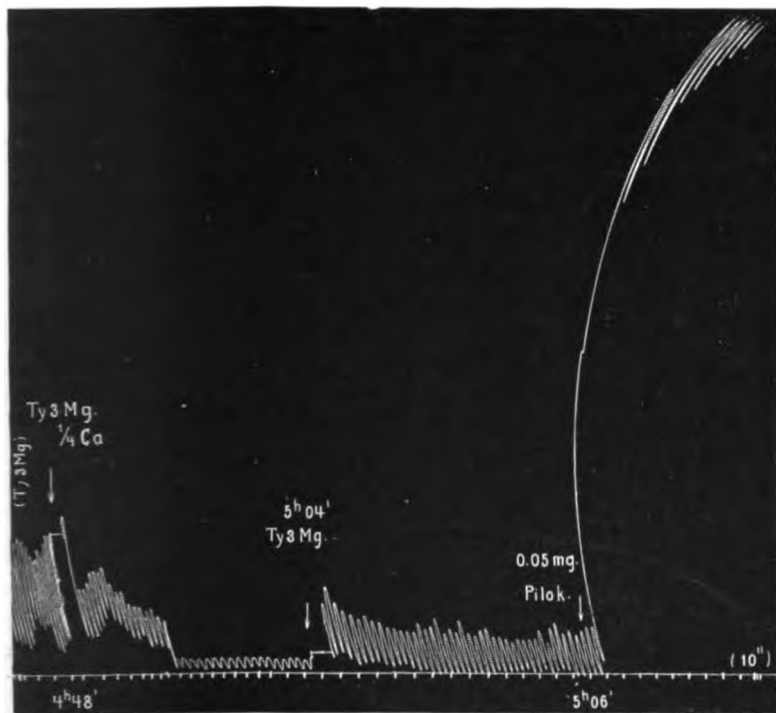


Abb. 4. Kaninchendünndarm.

In einer Tyrodelösung mit 0,03 % Mg Cl_2 (= Ty 3 Mg) wirkt die Senkung der Calciumkonzentration auf $\frac{1}{4}$ (= Ty 3 Mg $\frac{1}{4}$ Ca) nicht erregend, eher hemmend. Jedoch wirkt Pilocarpin auch bei diesem Mg-Gehalt erregend.

Noch auffälliger ist die Unwirksamkeit der Calciumabnahme, wenn auch die Kaliumkonzentration kleiner ist. Gibt man nach einer Tyrodelösung mit $\frac{1}{4}$ K. und $\frac{1}{8}$ Ca eine Lösung mit ebensoviel K, jedoch ohne Ca, so erhält man *gar keine erregende Wirkung*, sondern die Bewegungen verschwinden augenblicklich und der Tonus zeigt auch eine Senkung. Bei $\frac{1}{4}$ K. und $\frac{1}{8}$ Ca erhält man aber noch *ungestörte* Pilocarpinkontrakturen, nur beim längeren Verweilen in solchen kalium- und calciumarmen Lösungen wird die Pilocarpinwirkung schwächer. Die Calciumabnahme ist daher auch keine allgemeingültige Erklärung der Pilocarpinwirkung (Abb. 5 und 6).

Auch gleichzeitige Calciumabnahme und Natriumzunahme wirken nicht erregend unter solchen Umständen. Noch weniger wirkt

erregend eine Lösung ohne Ca mit mehr Na und mehr K, da zu der obigen Wirkung noch der lähmende Einfluß der Kaliumsteigerung sich hinzugesellt (Abb. 7).

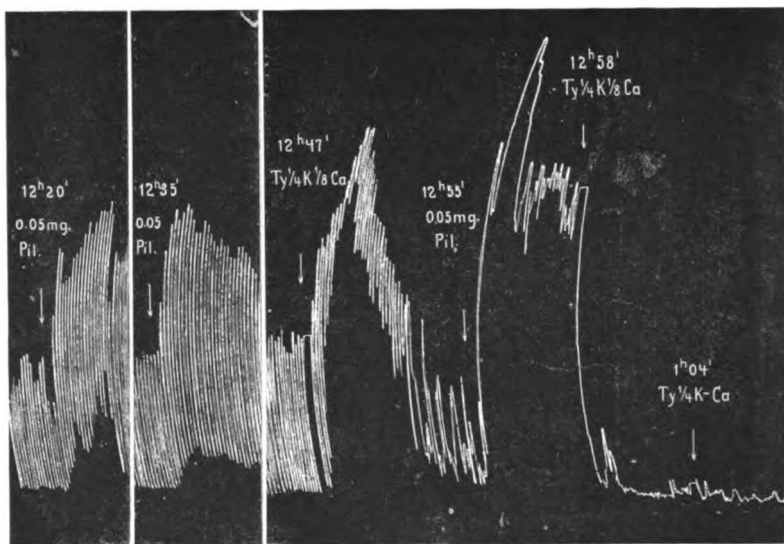


Abb. 5. Kaninchendünndarm.

Pilocarpin wirkt bei $\frac{1}{4}$ Kalium und $\frac{1}{8}$ Calcium etwas stärker als in normaler Tyrodelösung. Eine weitere Senkung der Calciumkonzentration (Tyrodelösung mit $\frac{1}{4}$ Kalium und ohne Calcium = Ty $\frac{1}{4}$ K-Ca) wirkt nicht erregend.

Diese Versuche zeigen daher, daß für die Erklärung nicht nur eine absolute, sondern auch eine relative Kaliumvermehrung ungenügend ist. Wenigstens kann man durch derartige Versuche keine Beweise einer solchen Auffassung erbringen.

Können die parasympathischen Gifte trotzdem durch Kalium wirken, jedoch im Gegenteil, durch eine Kaliumabnahme? Um eine relative Kaliumabnahme kann es sich wohl nicht handeln, weil die Vermehrung von Calcium immer hemmend wirkt. Die Abnahme des absoluten Kaliumgehalts wirkt aber erregend (19) (16) und ergibt auch starke, manchmal maximale Kontrakturen. Diese Wirkung kann aber auch nicht als Erklärung gelten, da bei erhöhtem Kaliumgehalt (0.04 bis 0.06 % KCl) die Wirkung der Abnahme der Konzentration bis zum normalen Werte (Diminutionswirkung) ausbleibt oder eben hemmend ist, während die Pilocarpinkontraktur auch bei Kaliumüberschuß in nicht verminderter Stärke zum Vorschein kommt.

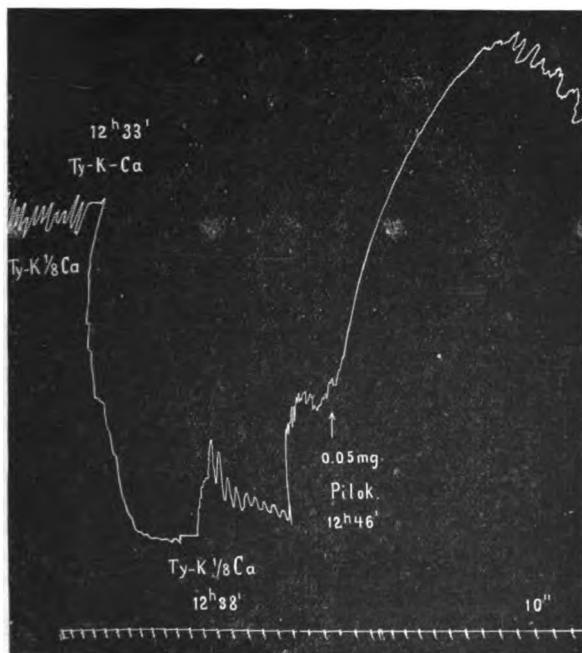


Abb. 6. Kaninchendünndarm.

In Abwesenheit von Kalium wirkt die Senkung der Calciumkonzentration von $\frac{1}{8}$ auf 0 stark tonussenkend, während Pilocarpin stark erregt.

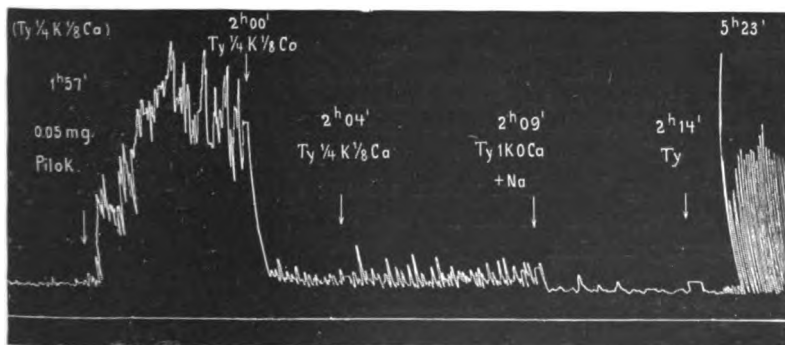


Abb. 7. Kaninchendünndarm.

Bei $\frac{1}{4}$ K und $\frac{1}{8}$ Ca wirkt Pilocarpin erregend; eine Senkung des Calciumgehalts verbunden mit einer gleichzeitigen Steigerung des Kalium- und Natriumgehalts (= Ty 1 KO Ca) wirkt hemmend. (Steigerung des Na-Gehalts über den normalen Wert mit 15%) Pilocarpin wirkt also entgegengesetzt als eine starke Vermehrung des Quotienten (K + Na):Ca.

Schlußbetrachtung.

Im vorangehenden haben wir zu zeigen versucht, daß es der Zondekschen Lehre, daß Parasympathicus und parasymphathische Gifte

über Kalium wirken, *an sicheren Beweisen mangelt*. Unsere Versuche zeigen, daß Kalium in der Umgebungsflüssigkeit für die parasympathischen Gifte nicht nötig ist, und außerdem, daß dort so eine absolute wie relative Änderung des Kaliumgehalts nicht mit diesen Stoffen parallel wirkt. Hieraus dürfen wir schließen, daß bei der parasympathischen Reizung das Kalium *nicht von der Lösung* (bzw. Blut) zur Stelle der Wirkung befördert wird.

Hiermit ist die Ionentheorie der vegetativen Innervation im allgemeinen trotzdem nicht abgelehnt. Man könnte denken, wie es auf S. 81 bereits erwähnt wurde, daß die Gifte das Ion von einem Depot zur Stelle der Wirkung befördern, etwa durch Steigern der Permeabilität einer trennenden Membran. Die Bedeutung dieser Erklärungsmöglichkeit könnte man zweierleiweise auffassen. Es wäre erstens möglich, daß für die Wirkung *gleichgültig* ist, *von wo* das mobilisierte Kalium herangeführt wird, und das vom inneren Depot freigemachte Kalium ebenso wirkt wie das von außen zugeführte. Es kann aber auch eine zweite Auffassung dieses Mechanismus nicht ausgeschlossen werden. Die im Innern der Zelle freigewordenen Ionen könnten nämlich einen ganz anderen, vielleicht eben entgegengesetzten Einfluß haben wie die von außen zugeführten. Und würde dann die parasympathische Wirkung durch den inneren Zuwachs an freien Kaliumionen erfolgen, so wäre eine Ähnlichkeit mit der äußerlich ausgelösten Kaliumwirkung gar nicht zu erwarten.

Die Möglichkeit einer solchen Theorie möchten wir vorderhand nicht diskutieren. Einen Teil des bisherigen Versuchsmaterials könnte man zum Beweis einer solchen Auffassung anführen, andere Beobachtungen würden aber dagegen sprechen. Diese Erklärung wäre aber mit der *Zondekschen* Theorie nicht identisch. Letztere fußt ja eben auf dem Parallelismus der Nerven-, Gift- und Ionenwirkung. Würden die Nerven und Gifte mit Hilfe der Ionen wirken, jedoch derartig, daß der Mechanismus eine Übereinstimmung mit der Wirkung von außen zugeführten Ionen ausschließt, so müßte man dies wohl einer *anderen Theorie* zuschreiben. Eine Theorie kann man ja nicht derartig umgestalten, daß sie auch die Unrichtigkeit der Beobachtungen miterklären soll, für deren Deutung sie eben aufgestellt worden war.

Aus unseren Versuchen wollen wir nur den Schluß ziehen, daß die Beweise der vorliegenden Ionentheorie der parasympathischen Reizung noch ungenügend sind.

Zusammenfassung.

Die Auffassung *Zondeks*, daß die parasympathisch erregenden Gifte durch eine lokale Kaliumanreicherung wirken, wird durch Versuche am überlebenden Kaninchendarm unwahrscheinlich gemacht.

1. Eine spezifische Beeinflussung der pharmakologischen Vagusreizung durch den Kaliumgehalt der Nährlösung ist nicht nachzuweisen.

2. Die bisherigen Angaben über Verschiebungen im Ionengehalt der Spüllösung bei Reizung der vegetativen Nerven bilden keine vertraubaren Anhaltspunkte für die Theorie.

3. Die Wirkungsrichtung von Kalium und Parasympathicus ist nicht immer dieselbe.

In kaliumarmer Lösung wirken Pilocarpin, Cholin, Acetylcholin unverändert stark, während eine Steigerung der Kaliumkonzentration entgegengesetzt (hemmend) wirkt. Mehrere Gründe sprechen auch dafür, daß eine relative Kaliumzunahme [Vergrößerung des $(K + Na) : Ca$ -Verhältnisses] die Parasympathicuserregung nicht vermitteln kann. Auch eine Abnahme des Kaliumgehalts ist für die Erklärung ungeeignet.

Literatur.

- 1) *S. G. Zondek*, Deutsch. med. Wochenschr. 1921, S. 47; diese Zeitschr. 121, 87, 1921; 132, 362, 1922; Klin. Wochenschr. 4, 905, 1925. — 2) *F. Kraus* und *S. G. Zondek*, Klin. Wochenschr. 1, 1773, 1922; 3, 735, 1924; 3, 996, 1924. — 3) *Kraus*, *Wollheim*, *Arnoldi*, *Zondek*, ebendasselbst 3, 707, 1924. — 4) *O. Loewi*, Pflügers Arch. 189, 239, 1921; 193, 201, 1922; usw. Vgl. auch *L. Jendrassik*, diese Zeitschr. 144, 520, 1924. — 5) *P. Neukirch*, Pflügers Arch. 147, 153, 1912. — 6) *W. Storm von Leeuwen* und *v. d. Broeke*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 88, 1920. — 7) *E. Jannink*, Dissertation, Utrecht 1921. — 8) *Howell*, Amer. Journ. Physiol. 21, 51, 1908. — 9) *J. Bouckaert*, Arch. intern. Physiol. 16, 453, 1921. — 10) *L. Asher*, Zeitschr. f. Biol. 78, 297, 1923. — 11) *N. Scheinfinkel*, ebendasselbst 82, 285, 1925. — 12) *Yasutake*, ebendasselbst 82, 605, 1925. — 13) *E. Wollheim*, diese Zeitschr. 151, 416, 1924. — 14) *K. Dresel* und *E. Wollheim*, Pflügers Arch. 205, 375, 1925. — 15) *Y. Okamoto*, ebendasselbst 204, 726, 1924. — 16) *L. Jendrassik* u. *E. Annau*, diese Zeitschr. 162, 207, 1925. — 17) *M. Rosenmann*, Klin. Wochenschr. 2, 1923; Zeitschr. f. exper. Med. 29, 334, 1922. — 18) *W. Straub*, Zentralbl. f. Physiol. 1905, S. 302; Pflügers Arch. 119, 127, 1907. — 19) *L. Jendrassik*, diese Zeitschr. 148, 116, 1924. — 20) *F. B. Hoffmann*, ebendasselbst 156, 278, 1925.
-

Über das Tryptoporphyrin.

Von

Sigmund Fränkel und Hermann Prinz.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spieglerstiftung in Wien.)

(Eingegangen am 30. Juni 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Chemie des Blutfarbstoffes hat in den letzten Jahren sehr bemerkenswerte Fortschritte gemacht. Die Arbeiten von *W. Küster*, *R. Willstätter* und *H. Fischer* haben eine, allerdings noch nicht restlose Klarheit über die Konstitution der färbenden Komponente des Hämoglobins gebracht. Es ist noch eine Anzahl von Divergenzen in den Anschauungen vorhanden, die sich auf die Verknüpfung der Pyrrolringe und die Stellung des Eisens in dem System beziehen. Festgestellt ist aber jedenfalls die Anwesenheit von vier Pyrrolringsystemen, durch welche die vier Stickstoffe des Hämatins sowie 16 Kohlenstoffe von den 34 vorhandenen erklärt werden. Die restlichen 18 Kohlenstoffe sind teils Brückenkohlenstoffe zwischen den Pyrrolringen, teils Seitenketten, welche vor allem durch die *W. Küsterschen* Arbeiten, insbesondere die oxydativen Versuche und die Überführung in die Hämatinsäuren Aufklärung gefunden haben.

Die Spaltung des Hämoglobins in den färbenden und den Eiweißanteil kann auf verschiedene Weise erfolgen. Wenn man unter Abschluß von Sauerstoff arbeitet, so erhält man dabei Hämochromogen, arbeitet man aber in Gegenwart von Luft, so erhält man Hämatin. Man kann durch Eisessig und Natriumchlorid bei Erhitzen die bekannten „*Teichmannschen* Kristalle“ erhalten, die man als Häminkristalle bezeichnet und die an Stelle der im Hämatin enthaltenen Gruppe FeOH die Gruppe FeCl enthalten.

Die Abspaltungsverfahren der prosthetischen Gruppe beruhen im wesentlichen auf dem gleichen Prinzip; entweder zerlegt man Hämoglobin mit schwefelsäurehaltigem Alkohol, wobei das Sulfat der färbenden Komponente in Lösung geht und das Globin ungelöst bleibt, oder man verwendet Eisessig, wobei der Globinanteil in Lösung geht und der Farbstoff zurückbleibt.

Verdaut man Blut mit Pepsin und Salzsäure, so erhält man ein Produkt, das sich durch Aufschwemmen in Aceton und Zusatz von Salzsäure zum großen Teil in Hämin überführen läßt; es ist also anscheinend das durch

Verdauung gewonnene Hämatin die Base, die durch Zusatz von Salzsäure in Chlor-Hämatin übergeht.

Das im Hämatin enthaltene Eisen kann man mit bromwasserstoff-gesättigtem Eisessig abspalten und gelangt so zum Hämatoporphyrin, dem eisenfreien Farbstoff, wobei aber zwei Moleküle Wasser an die doppelte Bindung angelagert werden. Dieses Hämatoporphyrin ist eine zweisäurige Base und bildet Ester und Äther.

Über die Einwirkung von Verdauungsfermenten auf Hämoglobin finden sich in der Literatur nur wenige Angaben.

Während Kühne behauptete, daß das Pankreasferment Hämoglobin angreife, kam F. Hoppe-Seyler¹ zu der gegenteiligen Anschauung und glaubte, daß Hämoglobin vom Pankreasferment überhaupt nicht angegriffen werde, was wohl ein Irrtum ist. Halliburton² fand, daß das Säurehämatin, welches im Magen bei der Verdauung gebildet wird, nicht diffusibel ist. Behandelt man es nachher mit Pankreassaft, so bildet sich ein von ihm nicht weiter untersuchtes Alkalihämatin, welches bei Gegenwart von Soda diffusibel ist.

Schon die Einwirkung von Pepsinsalzsäure auf Hämoglobin hat eine Abspaltung von Eisen zur Folge; diese Tatsache ist aber der verdünnten Salzsäure zuzuschreiben und die Abspaltung geht über ein gewisses Maß nicht hinaus. In 24 Stunden werden 5 bis 6% des vorhandenen Eisens abgespalten, und diese Menge ändert sich auch bei längerer Verdauung nicht wesentlich. Der Zusatz von Pepsin und Pankreaspräparaten soll an diesen Werten nichts ändern, und das abgespaltene Eisen soll auch nicht aus dem eigentlichen Blutfarbstoff stammen. Barkan³ meinte, daß eine Eisen-
abspaltung aus dem Blutfarbstoff selbst durch Verdauungssäfte bei der Magen- und Darmverdauung offenbar nicht stattfindet.

Zu anderen Resultaten kam aber Wolg. Lintzel⁴. Er fand, daß bei 14tägiger Pepsin-Salzsäureverdauung des Blutes 10% des darin enthaltenen Eisens abgespalten werden. Dieser Vorgang sei jedoch unabhängig von der Wirksamkeit der Fermente, da auch gekochte Fermente das gleiche Verhalten zeigen und aus kristallisiertem Hämoglobin mit 0,4%iger Salzsäure oder mit einem Phosphatpuffer von der Reaktion des Darmsaftes 7 bis 8% des vorhandenen Eisens abgespalten werden.

Als wir die im hiesigen Institut ausgearbeitete Methode der prolongierten Trypsinverdauung auf den Blutfarbstoff ausdehnten, um das basenreiche Globin als Ausgangsmaterial zu benutzen, beobachteten wir, daß die alkalische, klar filtrierte Verdauungsflüssigkeit sehr stark rot gefärbt war. Versetzte man diese alkalische Flüssigkeit mit verdünnter Essigsäure, so fiel in Flocken ein roter Körper aus, welcher, in schwachem Ammoniak gelöst, im Gegensatz zu den bisher bekannten Hämatin- und Hämatoporphyrinpräparaten keine Absorptionsstreifen im Spektrum zeigte. Aus dieser Substanz kann man im Gegensatz zum Blutfarbstoff mit

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. 1, 121.

² Brit. Med. Journ. 1, 824, 1904.

³ Georg Barkan, Zeitschr. f. physiol. Chem. 148, 124, 1925.

⁴ Wolfgang Lintzel, Zeitschr. f. Biol. 83, 289, 1925.

Eisessig und Natriumchlorid keine *Teichmannschen* Kristalle erhalten; ebensowenig konnten wir mit Pyridin und Schwefelammonium zu den sogenannten Hämochromogenkristallen gelangen. Diese Tatsachen waren sehr auffällig. Noch auffälliger war der Befund, daß der Eisengehalt unseres Präparats ein sehr geringer und in keiner rechenbaren Relation zu seinem Stickstoffgehalt war. Wir beobachteten weiter, daß die so gewonnene Substanz sich durch Lösen in verdünntem Ammoniak und Fällen mit Essigsäure leicht weiter reinigen ließ, daß sie aber nach dem Trocknen zur Konstanz bei Temperaturen über 100° sich in verdünnten Alkalien nicht mehr löste, so daß eine Abspaltung von Wasser aus dem Molekül beim Trocknen angenommen werden muß.

Die Reindarstellung der Substanz gab nun Klarheit darüber, daß das Molekül des Hämatins noch in anderer Beziehung fermentativ angegriffen worden war als im Sinne der Abspaltung von Eisen, wie beim Übergang vom Hämatin zum Hämatoporphyrin, nämlich im Sinne der Abspaltung von Seitenketten bei Erhaltung der vier Pyrrolringsysteme.

Versuchstell.

Wir sind bei zahlreichen Versuchen wesentlich in folgender Weise vorgegangen:

600 g kristallisiertes Oxyhämoglobin aus Pferdeblut wurden in 10 Liter einer 5%igen Sodalösung durch 3 Monate im Thermostaten bei Gegenwart von viel Chloroform und Toluol mit Trypsin verdaut. Die Verdauungslösung wurde abfiltriert, im Scheidetrichter vom Chloroform und Toluol getrennt und die erhaltene klare, rubinrot gefärbte Lösung mit Essigsäure angesäuert, wobei sich alsbald ein flockiger Niederschlag abschied. Verwendet man statt Essigsäure Weinsäure, so erhält man wohl eine Trübung, aber keine so gute Abscheidung wie bei Verwendung von Essigsäure, und erst auf Zusatz von Alkohol erfolgt die Fällung des Farbstoffs.

Der mit Essigsäure erzeugte Niederschlag wurde absitzen gelassen und von der überstehenden schwach gefärbten Flüssigkeit durch Dekantieren getrennt. In der Flüssigkeit ließ sich durch Versetzen mit Ferrocyankalium ionisiertes Eisen als Berlinerblau nachweisen.

Die Fällung wurde auf der Zentrifuge mit essigsaurem Wasser mehrfach gewaschen, hierauf in schwach ammoniakalischem Wasser gelöst, filtriert und mit Essigsäure wieder gefällt. Nach fünfmaligem Lösen und Fällen wurde die Substanz beim sechsten Mal fraktioniert gefällt; bei der Analyse zeigte es sich, daß die erste Fraktion 1,40%, die zweite dagegen 6,87% Asche enthielt. Die aschearme Fraktion wurde nun noch viermal umgefällt und in der ersten Fraktion der zehnten Fällung der Aschengehalt mit 1,12% festgestellt.

Die so gewonnene Substanz wurde im Vakuum getrocknet und auf ihr Verhalten gegen organische Lösungsmittel geprüft; sie war unlöslich in: Äthyl-, Methyl- und Isobutylalkohol, Aceton, Äther, Benzol, Toluol, Xylol, Petroläther, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Dimethylanilin. Es sind also die meisten organischen Solvenzien, soweit sie neutral sind, keine

Lösungsmittel für die Substanz, während sie in basischen Reagenzien, wie Ammoniak, Pyridin und Anilin, schneller oder langsamer in Lösung geht.

Es ist sehr auffällig, daß es so schwierig ist, diese Substanz aschefrei zu erhalten, und die Vermutung liegt nahe, daß die Asche ein wesentlicher Bestandteil der Substanz oder einer Verunreinigung der Hauptmenge eisenfreier Substanz ist. Wir untersuchten die Asche quantitativ und fanden, daß sie zur Gänze aus Fe_2O_3 besteht; die Menge von 1,12% Fe_2O_3 entspricht 0,78% Fe, steht also in gar keinem Verhältnis zu dem Eisengehalt des Hämatins, der *mehr als zehnmal* so groß ist.

Da die kleine Menge des eisenhaltigen Körpers, welche den eisenfreien Farbstoff verunreinigte, durch die umständliche Methode des Lösens und fraktionierten Fällens nicht zur Gänze entfernt werden konnte, wollten wir die saure Eigenschaft der Verbindung benutzen, um durch die Veresterung zu einem reineren Körper zu gelangen.

Veresterung.

Die vakuumtrockene Substanz wurde in absolutem Alkohol verteilt und durch die mit einer Kältemischung gekühlte Suspension mehrere Stunden trockenes Salzsäuregas geleitet. Es resultierte eine dunkel-rotbraune Lösung, die auf ein Gemisch von Soda und Eisstücken gegossen wurde, wobei sich ein rot gefärbter Niederschlag abschied. Dieser wurde bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion mit Wasser gewaschen, im Vakuum getrocknet und mit absolutem Alkohol am Rückflußkühler ausgekocht. Bei diesem Verfahren erhielten wir nur eine geringe Ausbeute, was wohl mit der Wasserabspaltung beim Trocknen, die wir schon früher erwähnt haben, zusammenhängen dürfte. Daher wurde bei einem zweiten Versuch das Ausgangsmaterial nach der Fällung mit Essigsäure und dem Waschen mit Wasser nicht im Vakuumexsikkator getrocknet, sondern durch wiederholtes Waschen mit absolutem Alkohol auf der Zentrifuge das Wasser verdrängt. Hierauf wurde die Substanz in absolutem Alkohol suspendiert und in beschriebener Weise in einer Kältemischung mit Salzsäure gesättigt, bis alles in Lösung gegangen war. Die Salzsäure wurde aus der Lösung in der Weise entfernt, daß man das Reaktionsgemisch mit der dreifachen Menge absoluten Alkohols versetzte, im Vakuum sehr stark konzentrierte, wieder mit absolutem Alkohol verdünnte und neuerlich einengte. Dieses Verfahren wurde so lange wiederholt, bis die überschüssige Salzsäure der Hauptsache nach vertrieben war.

Aus dem sirupösen Rückstand kristallisierte nichts; er wurde mit absolutem Alkohol aufgenommen, wobei die gesamte Substanz in Lösung ging, aber auch aus dieser Lösung konnte auf keine Weise eine Kristallisation erhalten werden. Daher wurde die Lösung im Vakuum stark eingengt, der Rest des Alkohols und der Salzsäure im evakuierten Exsikkator über Kalk, Paraffin und Schwefelsäure verdunstet und die Substanz bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die so erhaltene Verbindung ist nun im Gegensatz zur Ausgangssubstanz in verdünntem Ammoniak unlöslich, löst sich aber beim Kochen in wässriger Kalilauge. Während der Ausgangskörper sich in Alkohol nicht löst, ist der Ester in Alkohol löslich und läßt sich mit Aceton aus der Lösung wieder fällen. Ein anderes organisches Lösungsmittel für den Ester konnten wir nicht finden. Man scheidet also den Ester am besten in der Weise ab, daß man die konzentrierte alkoholische Lösung mit Aceton in großem Überschuß versetzt.

Esterchlorhydrat des Tryptoporphyrins.

Analysen:

4,930 mg	Substanz:	8,880 mg	CO ₂ ,	1,575 mg	H ₂ O.
3,830	„	6,905	„ CO ₂ ,	1,284	„ H ₂ O.
3,270	„	0,312 ccm	N ₂ (15°, 742 mm).		
2,435	„	0,230	„ N ₂ (14°, 742 „).		
4,440	„	0,817	„ n/100 AgNO ₃ .		
9,435	„	1,828	„ n/100 AgNO ₃ .		
11,625	„	0,125 mg	Asche.		

C₂₁H₁₉O₉N₄Cl. Ber.: C 49,75 H 3,75 N 11,05 Cl 7,01

Gef.: C 49,14 H 3,58 N 10,85 Cl 6,52

C 49,18 H 3,75 N 10,79 Cl 6,86

Gef. (auf aschefreie Substanz berechnet):

C 49,63 H 3,62 N 10,96 Cl 6,60

C 49,67 H 3,79 N 10,90 Cl 6,93

Asche 1,07, das ist Fe 0,75.

Wir hatten zu diesem Versuch ein Ausgangsmaterial verwendet, das nur 17 Tage lang verdaut worden war. Da auch der Ester noch einen Aschengehalt zeigte, war es denkbar, daß unser Ausgangsmaterial durch kleine Mengen von ungespaltenem Hämatin verunreinigt war, dessen Eisengehalt bei unseren Körpern als Asche zum Vorschein kam. Wir gingen daher, daran, das ursprüngliche Verdauungsprodukt möglichst rein darzustellen.

Von einer Verdauungslösung, die mit reinem Hämoglobin angesetzt worden war und mehr als 3 Monate im Thermostaten gestanden hatte, wurde ein Teil abfiltriert, mit Essigsäure angesäuert, der ausgeschiedene Niederschlag abgeschleudert und in Pyridin aufgelöst. Er löste sich darin langsamer als in Ammoniak, ging aber schließlich vollständig in Lösung und konnte daraus mit Essigsäure wieder gefällt werden. In einer kleinen Probe versuchten wir die ammoniakalische Lösung mit Weinsäure zu fällen, um das Eisen möglichst in Lösung zu halten; es zeigte sich jedoch, daß mit Weinsäure auch nach langem Stehen eine Fällung nicht eintrat.

Der mehrfach gelöste und wieder gefällte Körper wurde schließlich auf der Zentrifuge gründlich mit Wasser gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure und Kalk getrocknet.

Der so erhaltene Körper ist eine schwarze krümelige Substanz von bedeutender Härte, die bis 300° nicht schmilzt. Beim Erhitzen zeigt er bis zum Verbrennen keine Veränderung. Er wurde in der Achatschale feinst zerrieben, im Vakuumexsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und analysiert.

4,890 mg	Substanz:	9,070 mg	CO ₂ ,	1,260 mg	H ₂ O.
2,305	„	4,295	„ CO ₂ ,	0,620	„ H ₂ O.
4,235	„	0,464 ccm	N ₂ (16°, 738 mm).		
1,700	„	0,189	„ N ₂ (19°, 744 „).		
51,440	„	0,590 mg	Asche.		
12,085	„	0,140	„		

$C_{11}H_{14}O_9N_4$.	Ber.:	C 51,58	H 3,17	N 12,67
	Gef.:	C 50,84	H 3,02	N 12,34
		C 50,62	H 2,89	N 12,44
	Gef. (auf aschefreie Substanz berechnet):			
		C 51,35	H 3,05	N 12,46
		C 51,13	H 2,92	N 12,56
Asche:	1,147, das ist Fe	0,803		
	1,158, „ „ Fe	0,810		

Tryptoporphyrinanhydrid.

Der im Vakuum zur Konstanz getrocknete Körper wurde im Trockenschrank bei 120° 36 Stunden getrocknet.

24,670 mg Substanz. 2,990 mg Gewichtsverlust (Wasser); das entspricht 12,12% oder 3 Mol. H_2O auf 1 Mol Substanz.

Der auf diese Weise entstandene, um 3 Mol. H_2O ärmere Körper ist in Ammoniak und Pyridin nicht mehr löslich; es tritt also beim Erhitzen eine Wasserabspaltung ein, bei der die Carboxylgruppe anscheinend verschwindet. Die aus der Analyse ermittelte Zusammensetzung stimmt mit der eines Körpers von der Formel $C_{19}H_8N_4O_6$ überein.

2,600 mg Substanz: 5,580 mg CO_2 , 0,480 mg H_2O .

2,040 „ „ 0,259 ccm N_2 (15°, 738 mm).

38,800 „ „ 0,510 mg Rückstand (Fe_2O_3).

$C_{19}H_8O_6N_4$. Gef.: C 58,55 H 2,06 N 14,36

Ber.: C 58,76 H 2,06 N 14,43

Gef. (auf aschefreie Substanz berechnet):

C 59,31 H 2,09 N 14,54

Molekulargröße des Tryptoporphyrins.

Um die Molekulargröße unseres Körpers festzustellen, bestimmten wir seine Acidität, indem wir ihn in einer gemessenen Menge n/10 NaOH auflösten und mit n/10 Säure zurücktitrierten (Indikator: Phenolphthalein).

140,3 mg Substanz: 3 ccm n/10 NaOH.

$C_{19}H_{14}N_4O_9$. Ber.: 10,18 COOH

Gef.: 9,62 COOH

Das nach dieser Titration auf eine Carboxylgruppe entfallende Molekulargewicht beträgt 468, gegenüber einem durch Rechnung ermittelten Molekulargewicht von 442.

Tryptoporphyrin-Äthylester.

Von dieser Säure stellten wir nun den Äthylester in anderer Weise dar; zu diesem Zwecke schwemmten wir feinst gepulverte Substanz in absolutem Alkohol auf, versetzten mit etwas konzentrierter Schwefelsäure und ließen das Gemisch 24 Stunden stehen. Nach dieser Zeit hatte sich die Substanz zur Gänze aufgelöst; wir filtrierten die dunkelbraune, beinahe schwarze Flüssigkeit durch Asbest und gossen sodann in die zehnfache Menge Wasser; auf Zusatz von etwas Ammoniak fiel aus der Lösung ein dunkel-rothbrauner, flockiger Niederschlag, der auf der Zentrifuge abgeschleudert, mit Wasser

bis zum Verschwinden der *Nesslerschen* Reaktion gewaschen, im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet und dann analysiert wurde.

Die vorgenommene Äthoxylbestimmung ergab, in Übereinstimmung mit der bereits ausgeführten Aciditätsbestimmung, das Vorhandensein einer Äthoxylgruppe in 1 Molekül unseres Körpers (C_2H_5O auf 4 N).

2,940 mg Substanz: 5,655 mg CO_2 , 0,945 mg H_2O .

4,785 „ „ 9,235 „ CO_2 , 1,590 „ H_2O .

2,475 „ „ 0,258 ccm N_2 (17° , 738 mm).

4,705 „ „ 0,484 „ N_2 (14° , 736 „).

25,715 „ „ 0,265 mg Asche.

4,215 „ „ 1,828 „ AgJ.

3,125 „ „ 1,377 „ AgJ.

$C_{19}H_{13}O_8N_4 \cdot OC_2H_5$. Ber.: C 53,61 H 3,83 N 11,91 C_2H_5O 8,12

Gef.: C 52,46 H 3,60 N 11,68 C_2H_5O 8,32

C 52,65 H 3,72 N 11,66 C_2H_5O 8,45

Gef. (auf aschefreie Substanz berechnet):

C 52,98 H 3,63 N 11,79 C_2H_5O 8,40

C 53,17 H 3,75 N 11,77 C_2H_5O 8,53

Asche 1,03, das ist Fe 0,72.

Schließlich versuchten wir noch, unseren Körper mit Hydrazinhydrat zu reduzieren. Wir versetzten die ammoniakalische Lösung mit einem Überschuß an Hydrazinhydrat und ließen das Gemisch unter häufigem leichten Erwärmen 24 Stunden stehen. Hierauf verdünnten wir das Gemisch mit Wasser und säuerten mit Essigsäure an, wobei ein flockiger, rotbrauner Niederschlag ausfiel, der sich in starkem Eisessig auflöste. Die Analyse des gewaschenen und getrockneten Körpers ergab jedoch, daß er mit dem Ausgangskörper identisch war.

3,495 mg Substanz: 6,605 mg CO_2 , 0,925 mg H_2O .

2,900 „ „ 0,322 ccm N_2 (15° , 744 mm).

3,995 „ „ 0,444 „ N_2 (17° , 744 „).

$C_{19}H_{14}O_8N_4$. Ber.: C 51,58 H 3,17 N 12,67

Gef. (auf aschefreie Substanz berechnet):

C 51,56 H 2,96 N 12,56

N 12,66

Absorptionsspektrum.

Die ammoniakalische Lösung unseres Körpers wurde spektrophotographisch untersucht; als Lichtquelle wurde einmal ein Eisenfunken, das andere Mal Auerlicht verwendet.

Abb. 1 zeigt in der ersten Reihe das Spektrum des Eisenfunkens bei einer Belichtungszeit von 30 Sekunden, in der zweiten das Spektrum der Lösung in einer Konzentration, bei der bei einer Belichtungszeit von 3 Minuten die roten Strahlen die Lösung gerade noch passieren konnten und in den folgenden vier Reihen die Absorptionsspektren der auf $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ und $\frac{1}{16}$ der ursprünglichen Konzentration verdünnten Lösung.

Die Abb. 2 zeigt in den ersten fünf Reihen die Absorptionsspektren der Lösung in den gleichen Verdünnungen und mit der gleichen Belichtungszeit wie bei Abb. 1, jedoch bei Verwendung von Auerlicht als Lichtquelle;

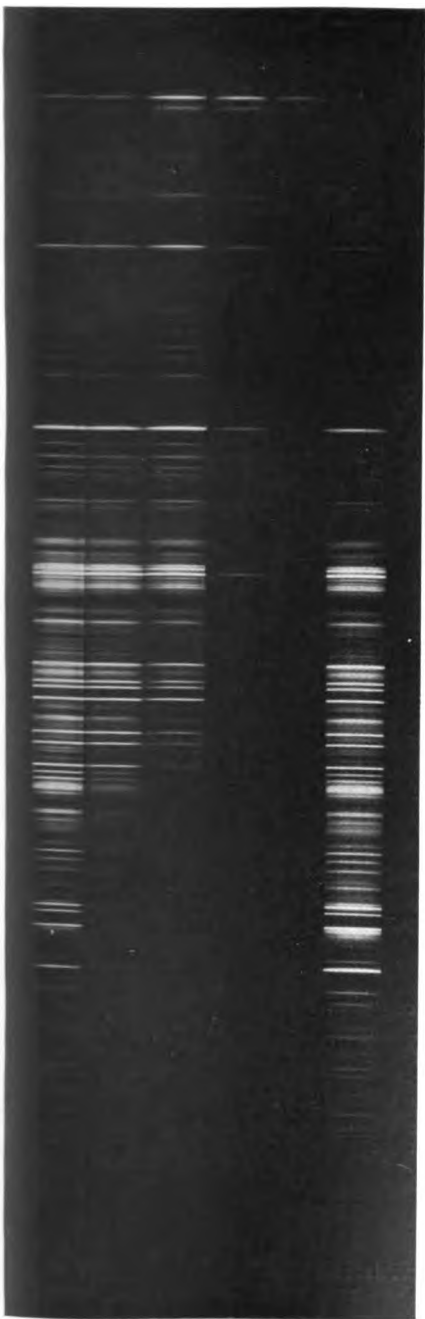


Abb. 1.

Biochemische Zeitschrift Band 188.

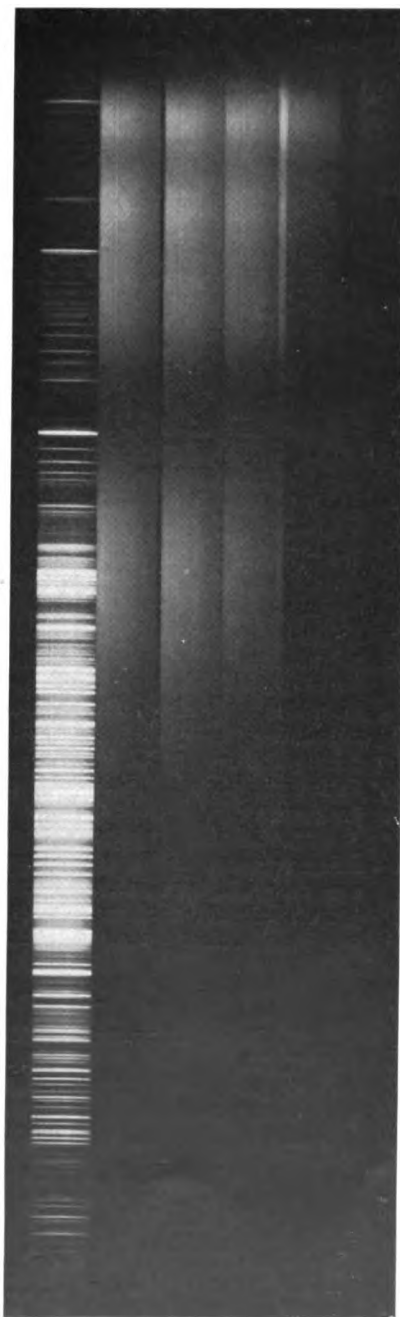


Abb. 2.

7

in der letzten Reihe ist wieder das Spektrum eines Eisenfunken, diesmal jedoch bei einer Belichtungszeit von 60 Sekunden, zum Vergleich mitphotographiert.

Aus diesen beiden Abbildungen geht hervor, daß *Absorptionlinien*, wie sie die *Spektra des Hämatins, des Hämatoporphyrins und der übrigen Derivate des Blutfarbstoffes aufweisen, im Spektrum unseres Körpers nicht auftreten*. Die in der linken (roten) Hälfte des Spektrums bei stärkerer Verdünnung auftretenden Verdunkelungen sind, ebenso wie das Verblässen des Spektralbildes nach der rechten (violetten) Seite hin, darauf zurückzuführen, daß die diesem Spektralgebiet entsprechenden Strahlen von der Lichtquelle nicht ausgesendet werden.

Heptacetyl-Tryptoporphyrin.

Von den in unserer Formel enthaltenen neun Sauerstoffatomen erscheinen zwei durch die Carboxylgruppe, deren Vorhandensein durch die Titration und die Veresterung bestimmt wurde, aufgeklärt. Die Funktion der restlichen sieben Sauerstoffe suchten wir in der Weise festzustellen, daß wir ein Acetylderivat unseres Körpers darstellten.

Wir versetzten etwa 0,2 g unserer Substanz mit einem großen Überschuß an Essigsäureanhydrid und erhitzten das Gemisch längere Zeit am Rückflußkühler; dabei ging ein Teil der Substanz in Lösung. Nach dem Auskühlen wurde die Lösung von dem ungelösten Rückstand durch Zentrifugieren getrennt und mit einem Überschuß an absolutem Alkohol versetzt. Diese Lösung wurde im Vakuum eingeeengt, da sie jedoch keine Neigung zeigte, zu kristallisieren, neuerlich mit absolutem Alkohol aufgenommen, am Wasserbad eingedampft und schließlich im evakuierten Exsikkator bis auf einen geringen Rest verdunstet. Als wir dann mit absolutem Alkohol aufnahmen, ging ein großer Teil der Substanz nicht mehr in Lösung; dieser wurde abfiltriert, mit absolutem Alkohol gewaschen und analysiert. Die Substanz schmilzt nicht und zeigt beim Erhitzen keine sichtbare Veränderung.

Das Filtrat, welches noch gefärbt war, ergab, mit einem Überschuß an Äther versetzt, noch eine sehr geringe Menge eines braunroten Niederschlags, der ebenfalls gewaschen, getrocknet und analysiert wurde; es konnten jedoch mit der vorhandenen Substanzmenge nur zwei Analysen gemacht werden, die aber weder übereinstimmende noch rechenbare Werte ergaben.

Analysen des Acetylderivats.

3,410 mg Substanz:	6,692 mg CO ₂ ,	1,207 mg H ₂ O.
3,875 „ „	7,616 „ CO ₂ ,	1,444 „ H ₂ O.
3,640 „ „	0,245 ccm N ₂ (21°, 752 mm).	
3,780 „ „	0,259 „ N ₂ (22°, 752 „).	
45,085 „ „	0,145 mg Asche.	

C ₃₃ H ₂₃ O ₁₆ N ₄ , Ber.:	C 53,80	H 3,80	N 7,61
Gef.:	C 53,54	H 3,96	N 7,55
	C 53,62	H 4,17	N 7,63

Gef. (auf aschefreie Substanz berechnet):

C 53,71	H 3,97	N 7,57
C 53,79	H 4,18	N 7,65

Asche 0,32, das ist Fe 0,22.

Die Analyse des ungelöst gebliebenen Körpers ergab folgende Werte:

3.845 mg Substanz:	7,208 mg CO ₂ ,	1,334 mg H ₂ O.
4.352 „ „	8,187 „ CO ₂ ,	1,462 „ H ₂ O.
3.582 „ „	0,387 ccm N ₂ (22°, 752 mm).	
3.764 „ „	0.410 „ N ₂ (22°, 752 „).	
59.770 „ „	0,585 mg Asche.	

C₁₉H₁₄O₉N₄. Ber.: C 51,58 H 3,17 N 12,67

Gef.: C 51,14 H 4,25 N 12,38

C 51,32 H 3,43 N 12,47

Gef. (auf aschefreie Substanz berechnet):

C 51,65 H 4,29 N 12,50

C 51,83 H 3,46 N 12,59

Asche 0,98, das ist 0,69 Fe.

Dieser Körper ist also identisch mit dem Ausgangsmaterial.

Aus diesen Untersuchungen ist zu ersehen, daß bei der prolongierten Trypsinverdauung von Oxyhämoglobin nicht nur eine Spaltung in die färbende und die Eiweißkomponente eintritt, sondern daß auch die färbende Komponente nach mehreren Richtungen wesentliche Veränderungen erleidet.

Vor allem ist es sehr auffällig, daß die Absorptionerscheinungen im Spektrum vollständig verschwinden, und daß in der Verdauungslösung ionisiertes Eisen nachweisbar ist; daß der nun durch Essigsäure fällbare rote Farbstoff so eisenarm ist, daß man annehmen muß, daß er der Hauptsache nach aus einem eisenfreien Farbstoff besteht, welcher eine kleine Menge des gleichen, aber noch eisenhaltigen Farbstoffes enthält. Dies beweisen das spektroskopische Verhalten sowie die Analysen.

Während man auf künstlichem Wege und auch unter pathologischen Umständen im Organismus aus dem Hämatin zum eisenfreien Hämatoporphyrin gelangt, zeigen unsere Versuche, daß unter der Einwirkung des tryptischen Ferments noch ganz andere Veränderungen vor sich gehen und ein Abbau von Seitenketten des Hämatoporphyrinmoleküls stattfindet. Der Vorgang, der im Körper zur Umwandlung des Blutfarbstoffs in die Gallenfarbstoffe führt, muß wesentlich verschieden sein von dem Abbau des Hämatins zum Tryptoporphyrin, da bei jenem gelbe, bei diesem ein roter Farbstoff entstehen. Die Relation zwischen C und N in den Blut- und Gallenfarbstoffen ist im wesentlichen dieselbe, während unsere Analysen zeigen, daß die Relation zwischen C und N geändert ist, denn statt der 34 C und 4 N des Hämatoporphyrins finden wir auf 4 N nur 19 C. Hingegen finden wir statt 4 O der Hämatinformel bzw. 6 O der Hämatoporphyrinformel in unserer Verbindung 9 O.

In der Häminformel nimmt man zwei Carboxylgruppen an, welche den Sauerstoffgehalt vollständig erklären; in der Hämatoporphyrin-

formel nimmt man zwei Carboxyl- und zwei Hydroxylgruppen an. Unsere Verbindung enthält nur 1 COOH und 7 OH. Da ja die Pyrrol-ringsysteme nicht angegriffen erscheinen, verteilen sich unsere 19 Kohlenstoffe auf 16 Pyrrol-C, 2 Brücken-C und die Carboxylgruppe, während die anderen Seitenketten anscheinend oxydativ abgebaut wurden, da an ihre Stelle OH-Gruppen getreten sind.

Die Trennung des eisenfreien von dem noch eisenhaltigen Farbstoff haben wir auf verschiedene Weise versucht; das beste Resultat gab die Acetylierung, bei welchem Vorgang man ein Präparat mit nur 2⁰/₁₀₀ Fe erhält. Nimmt man nun an, daß das Heptacetyl-Tryptoporphyrin $C_{33}H_{28}O_{16}N_4$ mit einem Körper von der Formel $C_{33}H_{28}O_{16}N_4Fe$ verunreinigt ist, so entspricht einem gefundenen Eisengehalt von 2⁰/₁₀₀ eine Verunreinigung der eisenfreien Substanz mit 2,5 % der eisenhaltigen. Daß die eisenhaltige Verbindung nicht etwa unverändertes Hämatin ist, wird durch das vollständige Fehlen des für das Hämatin charakteristischen Absorptionsspektrums sowie die Unmöglichkeit, auch nur die geringste Spur *Teichmannsche* Kristalle zu erhalten, bewiesen.

Über das Gelten der Traubeschen Regel bei der Hydrotropie.

Von

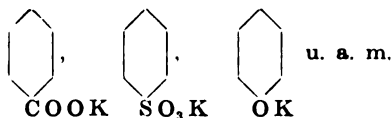
H. Freundlich und G. V. Slottman.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für physikalische Chemie und Elektrochemie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 1. Juli 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Als Hydrotropie bezeichnet *Neuberg*¹ die zuerst von ihm näher untersuchte Erscheinung, daß konzentrierte wässrige Lösungen einer Reihe organischer Stoffe imstande sind, die Löslichkeit vieler in Wasser schwer löslicher Stoffe auffallend zu erhöhen. Am stärksten wirken die Salze aromatischer Säuren, wie



Sie verleihen schwer löslichen organischen Verbindungen, Alkoholen, Säuren, Aminen und Alkaloiden eine Wasserlöslichkeit, die in einigen Fällen, wie beim Sulfonal, das Hundertfache der normalen Wasserlöslichkeit beträgt. Die Löslichkeit mehrerer schwerlöslicher anorganischer Stoffe wurde auch in diesen Lösungen gesteigert, aber in einem viel schwächeren Grade als es bei den organischen Stoffen der Fall war.

Im Laufe einer Untersuchung über den Einfluß kapillaraktiver Ionen auf die Kataphorese und die Koagulation eines Eisenoxydsols, bei der die sulfosauren Salze des Benzols und seiner Homologen benutzt wurden², haben wir gefunden, daß die *Traubesche* Regel bei den erwähnten beiden kolloidchemischen Erscheinungen ausgesprochen gültig ist. Hiermit steht im Einklang, daß diese Salze, ganz im Gegensatz zum Verhalten der meisten anderen Salze starker Säuren, auch an der

¹ Diese Zeitschr. 76, 107, 1916.

² Erscheint demnächst in der Zeitschr. f. physik. Chem.

Grenzfläche wässrige Lösung—Luft stark kapillaraktiv sind, und daß auch dort die *Traubesche* Regel ausgeprägt zutage tritt. Man wird dies folgendermaßen deuten: Diese Salze haben einen sehr entschieden asymmetrischen Bau, die Sulfogruppe ist der Wasserseite zu-, die Benzolgruppe ihr abgekehrt. Die in p-Stellung befindlichen aliphatischen Reste sind demgemäß gleichfalls dem Wasser schroff abgekehrt und daher der nichtwässrigen Phase zgedrängt, wobei jede neue CH_2 -Gruppe mit dem gleichen Betrag zur Wirkung kommt. Und dieser letzte Umstand ist ja die Voraussetzung für das Gelten der *Traubeschen* Regel nach der von *Langmuir*¹ gegebenen Theorie.

Nun war es gar nicht unwahrscheinlich, daß auch die Hydrotropie auf dem asymmetrischen Bau der hydrotropisch wirkenden Stoffe beruht. Es schien uns daher lohnend, eine Reihe hydrotropisch wirkender Salze, die einer homologen Reihe angehörten, zu untersuchen und zu prüfen, ob nicht beim Ansteigen in der homologen Reihe ein der *Traubeschen* Regel ähnliches Anwachsen der hydrotropischen Wirkung zu beobachten sei. Als im Wasser schwerlösliche Stoffe wurden Benzoesäure und Phthalsäure herangezogen, wegen der bequemen und genau durchführbaren Löslichkeitsbestimmung²; als asymmetrische, hydrotropisch wirkende Stoffe dienten die erwähnten Na-Salze der Benzol-, p-Toluol- und p-Äthylbenzolsulfosäure.

Versuchsanordnung.

Die Löslichkeit der Säuren wurde in der üblichen Weise bestimmt, indem man die Lösungen der hydrotropischen Stoffe mit einem Überschuß an Benzoesäure bzw. Phthalsäure versetzte und die Mischung danach 9 Stunden lang in einem Thermostaten bei $20 \pm 0,1^\circ$ mittels einer Rührvorrichtung in ständiger Durchmischung hielt. 20 ccm der entstandenen Lösung wurden danach durch ein Filter aus Glaswolle abpipettiert und mit n/25 NaOH mit Phenolphthalein als Indikator titriert. Die Lösungen wurden danach 2 Stunden lang in dem Bade gerührt und eine zweite Probe entnommen. Die zwei Bestimmungen mußten innerhalb 1% miteinander übereinstimmen.

Um die Ergebnisse in g/100 g H_2O bzw. Mol/Gesamt mol angeben zu können, haben wir die Ausdehnung, die 50 ccm H_2O durch Zusatz von verschiedenen Mengen der Salze erfahren, bestimmt. Daraus ließen sich die Ergebnisse, die durch das Titrieren in g/100 ccm Lösung gefunden wurden, in g/100 g H_2O umrechnen. Wegen des hohen Molekulargewichts der sulfosauren Na-Salze gegenüber dem des Wassers, ergab sich kein nennenswerter Unterschied zwischen den Einheiten g/100 g H_2O und Mol/Gesamt mol.

¹ Journ. Amer. Chem. Soc. **39**, 1883 ff., 1917.

² Es besteht freilich das Bedenken, an der Löslichkeitserhöhung könne auch eine Salzbildung beteiligt sein. Da aber die beiden Säuren um mehrere Größenordnungen schwächer sind als die Sulfosäuren, halten wir die dadurch bedingte Fehlermöglichkeit für gering.

Die große Löslichkeit der sulfosauren Salze machte es schwierig, sie von löslichen Verunreinigungen zu trennen. Um dies zu umgehen, haben wir die ausgewogenen Mengen der Salze mittels $n/50$ NaOH bzw. HCl genau neutralisiert, ehe sie den schwerlöslichen Stoffen zugesetzt wurden.

V Versuchsergebnisse.

Die von *Kahlbaum* bezogene Benzoesäure wurde dreimal aus Wasser umkristallisiert. Ihr Schmelzpunkt betrug 121°C . Als Mittelwert dreier Löslichkeitsbestimmungen erhielten wir den Wert $0,2865\text{ g}/100\text{ g H}_2\text{O}$, der in guter Übereinstimmung mit dem von *A. A. Noyes*¹ gefundenen $0,290\text{ g}/100\text{ g H}_2\text{O}$ war. Das benzolsulfosaure und das p-toluolsulfosaure Natrium bezogen wir gleichfalls von *Kahlbaum*; wir neutralisierten sie mit NaOH und kristallisierten sie dreimal aus Wasser um. Das p-äthylbenzolsulfosaure Natrium wurde von uns selbst aus Äthylbenzol hergestellt, nach einer von *Sempotowski*² angegebenen Methode, die nur die p-Verbindung liefern soll.

Die Tabellen I, II und III enthalten die Ergebnisse der Versuchsreihen mit Benzoesäure. c ist die Konzentration des hydrotrop wirkenden Salzes in Mol im Liter, L die Löslichkeit der Benzoesäure in $\text{g}/100\text{ g H}_2\text{O}$ oder Mol/Gesamtmol.

Tabelle I.

Beeinflussung der Löslichkeit der Benzoesäure durch Zusatz von benzolsulfosaurem Natrium.

c (Mol im Liter)	L g in 100 g H_2O	L (Mol in Gesamt- mol) $\cdot 10^3$
0	0,2865	0,4209
0,2640	0,3041	0,4464
0,4926	0,3441	0,5022
0,8775	0,4064	0,5898
1,953	0,8746	1,232

Tabelle II.

Beeinflussung der Löslichkeit der Benzoesäure durch Zusatz von p-toluolsulfosaurem Natrium.

c (Mol im Liter)	L g in 100 g H_2O	L (Mol in Gesamt- mol) $\cdot 10^3$
0	0,2865	0,4209
0,2463	0,3344	0,4911
0,4861	0,4019	0,5876
0,6931	0,4978	0,7245
0,9046	0,6419	0,9440

¹ Amer. chem. Journ. 20, 753, 1898.

² Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 22, 2663, 1889.

Tabelle III. Beeinflussung der Löslichkeit der Benzoesäure durch Zusatz von p-äthylbenzolsulfosaurem Natrium.

c (Mol im Liter)	L g in 100 g H ₂ O	L (Mol in Gesamt- mol) · 10 ³
0	0,2865	0,4209
0,2287	0,3462	0,5087
0,3405	0,4392	0,6295
0,4439	0,4669	0,6831
0,6432	0,6372	0,9377
0,9781	1,301	1,881

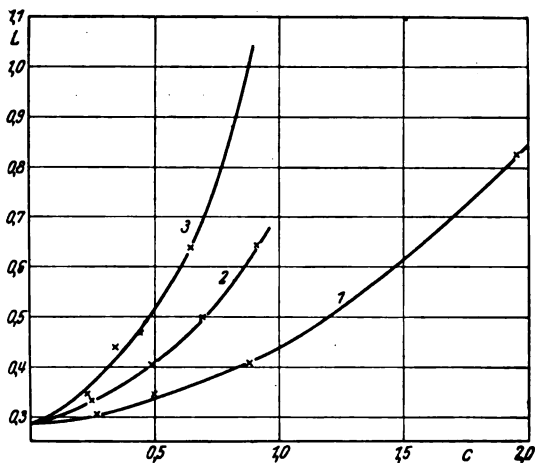


Abb. 1.

Wie aus Abb. 1, die eine graphische Darstellung der Ergebnisse enthält, zu sehen ist, laufen die Löslichkeitskurven konvex zur c -Achse und haben regelmäßige Abstände voneinander. Vergleicht man diejenigen Konzentrationen der drei sulfosauren Salze, die dieselbe Erhöhung der Löslichkeit der Benzoesäure hervorrufen, so findet man die in Tabelle IV eingetragenen Werte.

Tabelle IV. Vergleich der Konzentrationen, die eine bestimmte Erhöhung der Löslichkeit der Benzoesäure hervorrufen.

Hydrotrop wirkende Elektrolyte	Für ein $L = 0,5$ g in 100 g H ₂ O		Für ein $L = 0,7$ g in 100 g H ₂ O	
	c (Mol i. L.)	$\nu = \frac{c_m}{c_{m+1}}$	c (Mol i. L.)	$\nu = \frac{c_m}{c_{m+1}}$
Benzolsulfosaures Natrium	1,12	—	1,59	—
p-Toluolsulfosaures Natrium	0,70	1,6	1,00	1,6
p-Äthylbenzolsulfosaures Natrium	0,47	1,5	0,70	1,45

Die Konzentrationen beziehen sich auf Löslichkeiten von 0,5000 g/100 g H₂O bzw. 0,7000 g/100 g H₂O.

Auffallend ist das regelmäßige Anwachsen der hydrotropischen Wirksamkeit mit dem Ansteigen in der homologen Reihe; man erkennt es aus den in Tabelle IV angegebenen Werten von $\nu = \frac{c_m}{c_{m+1}}$, die ziemlich

konstant bleiben, auch beim Vergleich verschiedener L -Werte. Es entspricht dies Verhalten merklich dem nach der Traubeschen Regel gefundenen. Wohl ist der bei dieser Regel geltende Koeffizient ν größer, meist etwa 3,3 gegen etwa 1,5 bei diesen Versuchen. Aber man kennt auch andere Fälle, in denen sich Vorgänge entsprechend der Traubeschen Regel verhalten, aber mit einem kleineren Koeffizienten; dies gilt z. B. von der Beeinflussung der Kataphorese und Koagulation eines As₂S₃-Sols durch Aminsalze der Reihe NH₃(C₂H₅)Cl, NH₄(C₂H₅)₂Cl, HN(C₂H₅)₃Cl*.

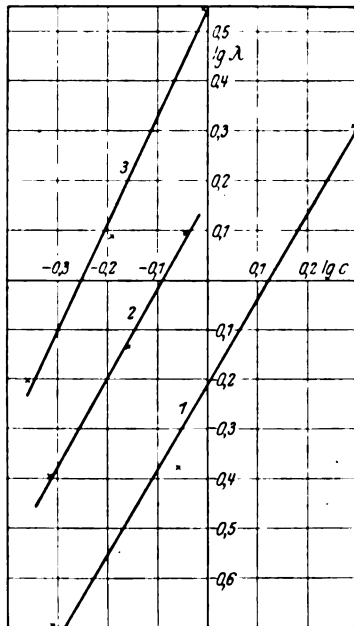


Abb. 2.

Abb. 1 läßt erkennen, daß die Kurven unverkennbar affin sind. Es ist dies besonders deutlich, wenn man die relative Löslichkeitserhöhung $\lambda = \frac{\Delta L}{L}$ zur Darstellung wählt. Ordnet

man die $\lg \lambda$ -Werte den $\lg c$ -Werten zu, so erhält man, wie Abb. 2 zeigt, angenähert gerade Linien, die einander merklich parallel sind¹. Es gilt

also eine Gleichung $\lambda = \lambda_1 c^n$; hier ist n für diese Reihe hydrotroper Salze ziemlich konstant, wodurch ja der Parallelismus der Geraden bedingt ist.

Die Zahlenwerte der Konstanten für die drei Salze waren die folgenden:

- für das benzolsulfosaure Natrium $\lambda_1 = 0,617$; $n = 1,70$
- „ „ p-toluolsulfosaure Natrium $\lambda_1 = 1,428$; $n = 1,80$
- „ „ p-äthylbenzolsulfosaure Natrium $\lambda_1 = 3,307$; $n = 2,04$

* Siehe die demnächst erscheinende Arbeit von Freundlich und Slottman, l. c., S. 101.

¹ Da die λ -Werte für kleine Werte von c sehr ungenau sind, finden sich in Abb. 2 nur die Werte verwendet, die bei großen c -Werten erhalten worden waren.

Auch in der Änderung der λ_1 -Werte mit der Natur der Salze äußert sich die *Traubesche Regel*, nur daß man nicht, wie beim Vergleich der ν -Werte, die Konzentrationen bei konstanter Löslichkeit vergleicht, sondern umgekehrt die relative Löslichkeitserhöhung bei konstanter Konzentration. Die Werte von $\frac{\lambda_{m+1}}{\lambda_m}$ sind in beiden Fällen gleich 2,32.

Die Phthalsäure, die als zweiter schwerlöslicher Stoff benutzt wurde, bezogen wir von *Merck*. Wegen der Unbestimmtheit des Schmelzpunktes (Zersetzung bei 196 bis 199°) prüften wir durch folgende Versuche, ob lösliche Verunreinigungen, die unsere Analyse stören konnten, vorhanden waren. 50 ccm H_2O wurden mit steigender Menge Phthalsäure (1 bis 5 g) versetzt und 20 ccm der entstandenen Lösungen gegen Phenolphthalein mit $n/25$ NaOH titriert. Die verschiedenen Löslichkeitsbestimmungen stimmten innerhalb der Fehlergrenze, unabhängig von der Menge des Bodenkörpers, miteinander überein. Als Mittelwert der Löslichkeit bei 20° C ergab sich 0,5740 g/100 g H_2O , die wegen der mangelhaften Literaturangaben zwar der Größenordnung nach, aber nicht quantitativ bestätigt werden konnten.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle V, VI, VII eingetragen.

Tabelle V.

Beeinflussung der Löslichkeit der Phthalsäure durch Zusatz von benzol-sulfosaurem Natrium.

c (Mol im Liter)	L g in 100 g H_2O	L (Mol in Gesamt- mol) $\cdot 10^3$
0	0,5740	0,6207
0,2699	0,6458	0,7001
0,5205	0,7725	0,7756
0,9593	0,8637	0,9499
0,9593	0,8720	0,9587

Tabelle VI.

Beeinflussung der Löslichkeit der Phthalsäure durch Zusatz von p-toluol-sulfosaurem Natrium.

c (Mol im Liter)	L g in 100 g H_2O	L (Mol in Gesamt- mol) $\cdot 10^3$
0	0,5740	0,6207
0,2530	0,6968	0,7499
0,4709	0,8200	0,8817
0,8841	1,156	1,233

Tabelle VII.

Beeinflussung der Löslichkeit der Phthalsäure durch Zusatz von p-äthylbenzolsulfosaurem Natrium.

c (Mol im Liter)	L g in 100 g H ₂ O	L (Mol in Gesamt- mol) · 10 ³
0	0,5740	0,6207
0,2066	0,7331	0,7957
0,4202	0,8716	0,9278
0,8130	1,367	1,417

Tabelle VIII enthält wieder einen Vergleich der Konzentrationen der sulfosauren Salze, die die Löslichkeit der Phthalsäure auf einen bestimmten Betrag 0,1000 g/100 g H₂O bzw. 0,8500 g/100 g H₂O erhöhten.

Tabelle VIII.

Vergleich der Konzentrationen, die eine bestimmte Erhöhung der Löslichkeit der Phthalsäure hervorrufen.

Hydrotrop wirkende Elektrolyte	Für ein $L = 0,7$ g in 100 g H ₂ O		Für ein $L = 0,850$ g in 100 g H ₂ O	
	c (Mol i. L.)	$\nu = \frac{c_m}{c_m + 1}$	c (Mol i. L.)	$\nu = \frac{c_m}{c_m + 1}$
Benzolsulfosaures Natrium	0,475	—	0,925	—
p-Toluolsulfosaures Natrium	0,280	1,7	0,525	1,8
p-Äthylbenzolsulfosaures Natrium	0,180	1,55	0,380	1,4

Auch hier wieder das Ansteigen in der hydrotropischen Wirksamkeit. Die ν -Werte für Benzoesäure und für Phthalsäure stimmen sogar zahlenmäßig miteinander überein; ein Befund, der zu der Vermutung Anlaß geben könnte, daß die Steigerung der hydrotropischen Wirksamkeit in dieser Reihe von dem Bau der schwerlöslichen Stoffe merklich unabhängig ist. Übrigens ist es auch für die Traubesche Regel kennzeichnend, daß sie von der Natur der Grenzflächen weitgehend unabhängig ist.

Die Ergebnisse lassen sich wiederum durch die allgemeine Formel $\lambda = \lambda_1 c^n$ wiedergeben. Die Werte der Konstanten sind für das

benzolsulfosaure Natrium $\lambda_1 = 0,632$; $n = 1,11$

p-toluolsulfosaure Natrium $\lambda_1 = 1,134$; $n = 1,22$

p-äthylbenzolsulfosaure Natrium $\lambda_1 = 1,367$; $n = 1,16$

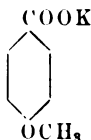
Das Verhältnis der λ_1 -Werte ist 1,79 bzw. 1,44.

Erörterung der Ergebnisse.

Sucht man zunächst nach der Ursache der hydrotropischen Wirkung der Salze, so ist es jedenfalls nicht eine löslichkeitserhöhende Wirkung, wie sie auch die heutige Dissoziationstheorie der starken Elektrolyte annimmt¹. Diese ist wesentlich durch die Ladung der Ionen bedingt, sollte sich also nicht bloß bei einer charakteristischen Gruppe von organischen Salzen finden. Es sei noch bemerkt, daß auch die Abhängigkeit von der Salzkonzentration eine andere ist; die Löslichkeitskurve ist gegen die Konzentrationsachse meist konkav und nicht konvex, wie bei den hydrotropisch wirkenden Salzen.

Neuberg hat neben der physikalisch-chemischen Erklärungsweise auch die Möglichkeit erörtert, daß es sich um eine Komplexbildung zwischen dem Salz und dem in Lösung gehaltenen Stoff handle. Merkwürdig ist ihm von diesem Standpunkt aus mit Recht, daß z. B. die Rhodansalze, die doch so ausgesprochen zur Komplexbildung neigen, gar nicht hydrotrop sind. Allerdings rechnet er gerade bei der p-Toluolsulfosäure mit der Möglichkeit einer Komplexbildung².

Eine Eigenschaft ist allen hydrotropen Salzen gemeinsam: Sie haben alle einen ausgesprochen asymmetrischen Bau. Am einen Ende des Moleküls befindet sich eine stark hydrophile Gruppe, etwa die Sulfo- oder Karboxylgruppe, am anderen Ende eine stark hydrophobe, etwa eine Kohlenwasserstoffkette. Aus den *Neuberg*'schen Versuchen läßt sich schon ableiten, daß die Hydrotropie abnimmt, wenn man diese Asymmetrie verringert oder gar zerstört; sie nimmt zu, wenn sie ausgesprochener wird. So ist z. B. das K-Salz der Benzoesäure stark hydrotrop, wesentlich schwächer das entsprechende Salz der m-Oxybenzoesäure; fast vernichtet ist die Eigenschaft beim K-Salz der p-Oxybenzoesäure, da ja dann an beiden Enden des Moleküls hydrophile Gruppen stehen. Wird umgekehrt die Hydrophilie der OH-Gruppen dadurch verringert, daß man eine CH₃-Gruppe einführt, wie beim K-Salz der Anissäure



so nimmt die Hydrotropie wieder zu. Ähnlich wie die Einführung der OH-Gruppe wirkt die andere negativer Atome und Atomgruppen,

¹ Siehe z. B. *Brönsted* und *Frl. Petersen*, Journ. Amer. Chem. Soc. **43**, 2265, 1921.

² Diese Zeitschr. **76**, 149, 1916.

wie etwa eines Halogens oder der NO_3 -Gruppe. Charakteristisch ist auch, daß das äthylsulfosaure Natrium nicht hydrotrop ist: die OH_3 -Gruppe steht der Sulfogruppe viel zu nahe, als daß das Salz einen ausgesprochen asymmetrischen Charakter zeigen könnte. Aus unseren Versuchen geht weiter hervor, daß die Hydrotropie regelmäßig zunimmt, wenn die Asymmetrie ausgesprochener wird, wenn etwa die Zahl der CH_2 -Gruppen am einen Ende des Moleküls zunimmt.

Diese Erfahrungen führen zu folgender Anschauung: Die asymmetrischen Moleküle lagern sich an die Oberfläche des schwerlöslichen Stoffes an, derart, daß die hydrophile Gruppe, also in unserem Falle die Sulfogruppe, dem Wasser zugekehrt ist, die hydrophobe dem festen Stoff. Da sich diese Orientierung des hydrotropen Salzes freiwillig einstellt, also einem Sinken der freien Energie entspricht, so wäre es schon möglich, daß dadurch ein gewisser Bruchteil des schwerlöslichen festen Stoffes zu einer größeren Grenzfläche ausgedehnt wird, als es unter den Bedingungen einer regelrechten Sättigung der Fall ist. In einem solchen Zustande größerer Grenzfläche befindet sich der hydrotrop gelöste Anteil. Es ergibt sich die Frage: Ist der schwerlösliche Stoff, in unserem Falle die Benzoesäure bzw. Phthalsäure, in der Lösung des hydrotropen Salzes durchaus echt oder zum Teil kolloid gelöst? Eine Beobachtung *Neubergs* legt den Gedanken nahe, er befände sich zum Teil in kolloider Lösung. Er schreibt¹: „Nicht unerwähnt bleibe schließlich, daß vor Eintritt der glatten Auflösung öfter die Bildung eigenartig dichroitisch gefärbter, optisch nicht homogener Phasen zu beobachten ist, daß die Lösung manchmal nicht sofort, sondern erst nach einiger Zeit vollständig wird, und daß der gleichmäßig klaren Auflösung bisweilen ein Zustand vorausgeht, bei dem der zu lösende wasserunlösliche Stoff in dicken Schlieren oder stark lichtbrechenden Tropfen nach Art der flüssigen Kristalle in dem Medium herumswimmt“. Der Zustand der Benzoesäure bzw. Phthalsäure möchte etwa dem eines sogenannten Kolloidelektrolyten ähneln, bei dem ein Teil kolloid-, ein Teil echt gelöst ist. Einfache qualitative Versuche, wie die gewöhnliche Dialyse, erlauben daher keine Entscheidung. Es ist selbstverständlich und wurde durch eigene Versuche bestätigt, daß die Benzoesäure auch in Lösungen eines hydrotropisch wirkenden Salzes durch eine Pergamentmembran dialysiert. Man müßte schon die freie Diffusion der Benzoesäure in der Lösung eines solchen Salzes verfolgen, einmal im verdünnten Zustande der echten Lösung, einmal in dem der konzentrierten Lösung, wie man sie nur bei Gegenwart des hydrotropischen Salzes erreichen kann. Aus etwaigen Unterschieden in der

¹ Diese Zeitschr. 76, 120, 1916.

Diffusionskonstanten bzw. im ganzen Verhalten bei der Diffusion könnte man eindeutige Schlüsse ziehen. Derartige Versuche sollen noch durchgeführt werden. Sie mußten vorläufig unterbleiben, da der eine von uns nach den Vereinigten Staaten zurückzukehren genötigt ist. Es wäre auch wichtig zu prüfen, ob die hydrotropisch wirkenden Salze in konzentrierter Lösung selbst den Charakter von Kolloidelektrolyten haben. Erst aus dem Ergebnis dieser Versuche wird man auch entscheiden können, ob die von uns gefundene Ähnlichkeit des Verhaltens mit dem nach der *Traubeschen* Regel geltenden darauf beruht, daß die beiden Erscheinungen in ihrem Wesen übereinstimmen, indem etwa in beiden Fällen asymmetrische Stoffe an Grenzflächen eine bestimmte Orientierung erfahren, oder ob die Ähnlichkeit mehr äußerlich ist. Ebenso möchte man erwarten, daß kein hydrotroper Einfluß bei einem schwerlöslichen Stoff vorhanden ist, der nur hydrophile Gruppen nach außen kehrt.

Dann ist auch die charakteristische Form der *L-c*-Kurve zu beachten; was sie bedeutet, wird man auch erst sicher sagen können, wenn man darüber Bescheid weiß, ob die entstehende Lösung ein- oder zweiphasig ist. Es sei nur jetzt schon auf die Ähnlichkeit der Gleichung $\lambda = \lambda_1 c^n$ mit der Beziehung hingewiesen, die die Abhängigkeit des Quellungsdruckes von der Konzentration eines Gels wiedergibt¹, oder der sehr ähnlichen Gleichung, die nach *Wo. Ostwald* und *Mündler*² für den osmotischen Druck konzentrierter Lösungen gilt.

Zusammenfassung.

1. Es wurde die Löslichkeitszunahme von Benzoesäure und Phthalsäure in wässriger Lösung bei Gegenwart von drei hydrotropisch wirkenden Salzen, den Na-Salzen der Benzol-, p-Toluol- und p-Äthylbenzolsulfosäure, die sich um je eine CH_2 -Gruppe unterscheiden, in verschiedenen Konzentrationen untersucht.

2. Die Abhängigkeit der relativen Löslichkeitszunahme $\lambda = \frac{\Delta L}{L}$ von der Konzentration des hydrotrop wirkenden Elektrolyten c läßt sich in allen Fällen durch eine Gleichung

$$\lambda = \lambda_1 c^n$$

ausdrücken. λ_1 und n sind Konstante, n hat Werte zwischen 1,1 und 2,0.

¹ *E. Posnjak*, Kolloidchem. Beih. **3**, 417, 1912.

² Kolloid-Zeitschr. **24**, 7, 1919.

3. Vergleicht man die Konzentrationen der verschiedenen Salze, die der gleichen Löslichkeitserhöhung entsprechen, so haben sie ein konstantes Verhältnis zueinander. Der Koeffizient $\nu = \frac{c_m}{c_m + 1}$ hat im Mittel einen Wert von etwa 1,5. Das Verhalten erinnert an das bei der Traubeschen Regel an Grenzflächen Geltende, wenn auch der Koeffizient kleiner ist als man ihn sonst bei der genannten Regel findet.

4. Aus 3. geht hervor, daß die hydrotropische Wirkung der Salze mit dem Grad ihres asymmetrischen Baues zunimmt, eine Folgerung, die auch aus der Neubergschen ersten Untersuchung über die Hydrotropie deutlich hervorgeht.

Über Beeinflussung der Wasserstoffionenkonzentration des Blutes durch chemotherapeutische Stoffe.

Von

Adolf Feldt und Rafael Vara-Lopez.

(Aus dem physikalisch-chemischen Laboratorium der Chemischen Fabrik
vorm. E. Schering, Berlin.)

(Eingegangen am 3. Juli 1927.)

Im Blute von Menschen und Tieren, die mit chemotherapeutischen Mitteln behandelt werden, treten tiefgreifende Veränderungen auf, die besonders nach intravenöser Injektion in kurzer Zeit nachweisbar sind. So ist es von Salvarsan, Germanin und Bismuthyltartraten bekannt, daß sie an die Plasmakolloide verankert werden. Durch Germanin und Salvarsan wird die Gerinnbarkeit des Blutes aufgehoben, sogar die Koagulierbarkeit durch Hitze von Plasma und Serum vermindert oder aufgehoben¹.

Die Wasserstoffionenkonzentration des Blutes, die zu den am zähesten festgehaltenen Konstanten des Tierkörpers gehört, wird durch therapeutische Maßnahmen nachweislich verändert.

*Fritz*² fand nach natürlicher (Budapest-Davos) und künstlicher (pneumatische Kammer) Luftverdünnung eine Verschiebung des p_H nach der sauren Seite, die bei Katzen noch ausgeprägter war als bei Kaninchen. Nach *Tomasson*³ (Literatur) ist während der Äthernarkose das p_H des Blutes verschoben, beim Menschen meist nach der alkalischen, bei Tieren nach der sauren Seite. *Brugsch* und *Hersters*⁴ fanden bei hungrigen Kaninchen nach Insulindosen, die zu Krämpfen führten, eine Verschiebung des p_H nach der sauren Seite um etwa 0,2.

Die p_H des Blutes und der Gewebe ist ohne Zweifel von großem Einfluß auf den Ablauf der Infektionskrankheiten und auf die eingedrungene Erreger.

¹ Literatur s. *Schlossberger* in Kollé-Zieler's Handb. d. Salvarsantherap. 1. 140 und 145, 1924.

² Diese Zeitschr. 170, 236, 1926.

³ Ebendasselbst 170, 330, 1926.

⁴ Ebendasselbst 175, 130, 1926.

Bisher sind nur Ansätze zur experimentellen Lösung dieser Frage bekannt geworden. Von *Schade*¹ und seinen Mitarbeitern ist die Bedeutung der Wasserstoffzahl in entzündeten Geweben und Entzündungssekreten nachgewiesen worden. Die Wachstumskurve von Tuberkelbazillen fällt im Kulturmilieu mit ihrem Maximum und ihren beiden zum Teil abfallenden Schenkeln ganz in die Breite der Entzündungsazidose hinein (zwischen etwa 6,3 und 7,3).

Wir prüften die Beeinflussung der H⁺-Konzentration des Blutes normaler und infizierter Tiere durch chemotherapeutische Mittel. Die Bestimmung des p_H erfolgte potentiometrisch mit der stehenden Gasblase in der U-Elektrode. Anfangs wurde bei jeder Blutprobe gleichzeitig eine Messung mit der Chinhydronelektrode vorgenommen. Die Resultate mit beiden Elektroden verliefen in der Regel gleichsinnig. Jedoch erwies sich die Wasserstoffelektrode als deutlich zuverlässiger, so daß wir zuletzt ausschließlich mit ihr arbeiteten. Durch die Gasblase wurde der Kohlensäurefehler möglichst ausgeschaltet.

Zu den Versuchen verwandten wir Kaninchen. Das Blut wurde mittels Spritze aus den Ohrvenen entnommen, wobei reizende Substanzen (Toluol) nicht zur Verwendung kamen. Die Venen wurden durch vorsichtiges Reiben des Ohres erweitert, wodurch eine länger dauernde Reizung und eine dadurch bedingte erhöhte Kohlensäurespannung im Stauungsgebiete wegfielen.

Das p_H des Blutes normaler Kaninchen schwankte in unseren Versuchen zwischen 7,02 und 7,60. Um zu prüfen, wie die mehrfach wiederholte Blutentnahme aus den Ohrvenen auf das p_H einwirkt, wurde bei drei Normaltieren Blut in Intervallen von 10 Minuten, $\frac{1}{2}$ bis 1 bis 3 Stunden entnommen und festgestellt, daß die p_H konstant blieb.

Ebenso beweist Tabelle I, die das Resultat einer intravenösen Kochsalzeinspritzung wiedergibt, daß die Injektion einer indifferenten Lösung das p_H des Blutes nicht verändert.

Tabelle I.

Datum	p_H vorher	p_H nach 55 Min.	p_H nach 2 Std.
16. VI. 1927	7,18—7,19	7,19	7,18—7,19

Von chemotherapeutischen Mitteln verwandten wir das Trypaflavin, Solganal und Salvarsannatrium. Die wässrige Lösung von salzsaurem Trypaflavin reagiert sauer, von Salvarsannatrium und Solganal schwach alkalisch.

Trypaflavin wurde in Dosen von 0,005 g pro Kilo Körpergewicht gespritzt. Drei normale Tiere zeigten eine Verschiebung des p_H nach

¹ Die physikalische Chemie in der inneren Medizin 1923, S. 103; Kolloid-Zeitschr. 40, 258, 1926.

der sauren Seite um 0,2 bis 0,25. Die aktuelle Reaktion des Blutes veränderte sich nicht unmittelbar nach der Injektion, sondern erst im Laufe von 20 Minuten bis 4 Stunden.

Dasselbe Resultat wurde bei drei Kaninchen beobachtet, die mit Salvarsannatrium behandelt wurden. Ein Tier zeigte eine schnelle Wiederherstellung des p_H auf die anfängliche Höhe, vorübergehend trat eine Verschiebung nach der alkalischen Seite auf. Bei den übrigen Tieren wurde während der Beobachtungszeit von 1 bis 4 Stunden eine Verschiebung nach der sauren Seite festgestellt.

Mit Solganal wurden drei normale Tiere mit Dosen von 0,05 g pro Kilo behandelt. Bei zwei Kaninchen war das p_H nach der sauren, bei einem nach der alkalischen Seite verschoben.

Tabelle II.

Beeinflussung des p_H des Blutes normaler Kaninchen. Intravenöse Injektion von Trypaflavin, Salvarsan, Solganal.

Nr.	Datum	Gewicht g	p_H vorher	Mittel	p_H nach verschiedenen Zeiten			
1	31. V.	3300	7,35	0,018 g Trypaflavin	20'	1h40'	2h40'	
					7,29	7,24	7,10	
2	1. VI.	1800	7,35	0,008 g "	24'	1h		
					7,13	7,15		
3	2. VI.	3300	7,60	0,016 g "	15'	2h	3h30'	
					7,59	7,60	7,40	
4	7. VI.	2900	7,29	0,075 g Salv.-Na	30'	2h		
					6,76	6,71		
5	11. VI.	3400	7,53	0,085 g "	25'	1h		
					7,51	7,24		
6	14. VI.	3300	7,11	0,093 g "	35'	1h	1h30'	3h20'
					6,65	7,12	7,10	7,27
7	8. VI.	3250	7,02	0,16 g Solganal	30'	2h15'	3h30'	4h30'
					7,24	7,38	7,15	7,08
8	9. VI.	3700	7,34	0,19 g "	45'	1h	2h	3h
					7,11	7,18	7,28	7,33
9	10. VI.	3400	7,49	0,17 g "	30'	2h	4h	
					7,44	7,28	7,44	

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das p_H des Blutes normaler Tiere durch intravenöse Injektion von chemotherapeutischen Stoffen in deutlicher Weise beeinflußt wird. Die Verschiebung findet meist nach der sauren Seite, ausnahmsweise, bei anfänglich niedrigem p_H , in entgegengesetztem Sinne statt. Daraus, daß dieser Erfolg nicht unmittelbar nach der Injektion, sondern stets erst nach einiger Zeit zu beobachten ist, folgern wir, daß hierbei die *Reaktion der eingespritzten Lösung* keine Rolle spielt, sondern offenbar Veränderungen, die durch die chemotherapeutischen Mittel im Stoffwechsel der Zellen hervor-

gerufen werden, in erster Linie wohl der Zellen des retikuloendothelialen Systems¹.

In Ergänzung der Versuche an normalen Kaninchen untersuchten wir den Einfluß von Salvarsan und Solganal auf das p_H des Blutes syphilitischer Tiere.

Tabelle III.

p_H des Blutes syphilisinfizierter Kaninchen. Intravenöse Behandlung mit Solganal und Salvarsan.

Nr.	Datum	Gewicht g	p_H vorher	Mittel	p_H nach verschiedenen Zeiten				
10	15. VI.	2000	6,85	0,1 g Solganal	30'	1h30'	2h30'	5h	24'
					6,93	7,18	7,15-7,18	6,55	6,86
11	16. VI.	2800	6,82	0,075 g Salv.-Na	30'	2h	3h	4h15'	
					6,91	7,03	6,60	7,25	

Kaninchen 10 und 11 waren am 28. April 1927 beiderseits skrotal in eine Hauttasche infiziert worden. Am 14. Juni wiesen sie beiderseits große ulcerierte Syphilome auf, der Umfang betrug etwa 3 : 4 : 2 bzw. 2 : 2 : 5 : 2 cm. Auffallend war bei beiden Tieren, daß das Blut vor der Behandlung ein sehr niedriges p_H von 6,82 bis 6,85 aufwies. Das erste Tier mit Solganal 0,05 g pro Kilogramm Körpergewicht, das andere mit 0,25 g pro Kilogramm Salvarsannatrium behandelt. In beiden Fällen wurde das niedrige p_H deutlich nach der alkalischen Seite verschoben, die bereits $\frac{1}{4}$ Stunde nach der Injektion einsetzte. Das Maximum war beim ersten Kaninchen nach $1\frac{1}{2}$ Stunden erreicht, hielt sich 2 Stunden auf gleicher Höhe und sank nach 5 Stunden unter die anfängliche Größe. Am folgenden Tage war die aktuelle Reaktion des Blutes dieselbe, wie vor der Injektion.

Beim Salvarsantier zeigte sich unter Schwankungen gleichfalls eine Verschiebung nach der alkalischen Seite, die nach 4 Stunden 0,45 betrug.

In diesem Zusammenhang sei auf die Befunde von *Bethe*² und von *Warburg*³ hingewiesen. Nach *Bethe* werden Medusen durch HCl und NaOH gelähmt, bevor die H⁺ bzw. OH⁻ in das Innere eindringen. *Warburg* zeigte, daß die Atmung befruchteter Seeigelleier um über 100 % gesteigert werden kann, wenn die OH⁻-Konzentration des Meerwassers um ein geringes von 10^{-8} auf 10^{-6} gesteigert wird, wobei die H⁺-Konzentration im Innern der Zellen unverändert bleibt. In beiden Fällen werden wichtige Funktionszustände von Einzellern durch Änderung des Milieus hervorgerufen, eine Oxydationssteigerung bzw. Lähmung von der Oberfläche her ausgelöst, ohne daß ein Eindringen wirksamer Ionen ins Zellinnere stattfindet.

¹ Vgl. *Feldt* und *Schott*, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 107, 453, 1927.

² *Bethe*, Pflügers Arch. 127, 219, 1909.

³ *Warburg*, diese Zeitschr. 29, 414, 1910.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen dahin ergänzt werden, daß außer der H^+ -Konzentration des Blutes die Alkalireserve und Kohlensäurekapazität bestimmt werden.

Für freundliche Unterweisung in der Anwendung der Methoden der p_H -Bestimmung und dauernde Kontrolle der Versuchsergebnisse sind wir Herrn Dr. Henschel zu großem Danke verpflichtet.

Zusammenfassung.

1. Das p_H des Blutes normaler und syphilitischer Kaninchen wird durch intravenöse Injektion von Trypaflavin, Salvarsan und Solganal in therapeutischen Dosen nachweislich verschoben.
 2. Die Änderung des p_H tritt nicht unmittelbar, sondern erst einige Zeit nach der Injektion auf.
 3. Die Verschiebung des p_H erfolgt beim normalen Tier meist nach der sauren Seite.
 4. p_H des Blutes syphilitischer Kaninchen ist niedriger als normal und wird durch Chemotherapeutika nach der alkalischen Seite verschoben.
-

**Physikalisch-chemische Studien
über den Einfluß oberflächenaktiver Stoffe auf Samenzellen
(Weizen) und Sporen von *Tilletia tritici* (1).**

Von
A. C. Wolf.

(Mitteilung der Württembergischen Landwirtschaftskammer, Abteilung
Pflanzenbau-Laboratorium.)

(Eingegangen am 5. Juli 1927.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Zu den Stoffen, die leicht ins Protoplasma diosmieren (2) gehören die einwertigen Alkohole, Methylalkohol, Äthylalkohol. Stoffe, die sich an der Oberfläche sammeln und positiv adsorbiert werden, entsprechend dem *Gibbs-Thomson*schen (3) Theorem. *I. Traube* (5) (2) hat die Oberflächenspannung gemessen, er fand z. B. für Methylalkohol die Steighöhe 88,6, für Äthylalkohol 84,0 (Wasser = 91,5) bei Anwendung von 0,25 mol. Lösungen bei 15°. Methylalkohol und Äthylalkohol folgen ebenso der Lipoidtheorie und Permeabilitätsregel von *Overton* (4).

Will man, wie im vorliegenden Falle, die Wirkung des Äthylalkohols auf das Samenkorn (Weizen) untersuchen, das man sich aus hydrophilen Kolloiden in Gelform bestehend denken kann, so wird man die Permeabilität der Zellen auch unter dem Gesichtspunkte der Quellung betrachten, d. h. je mehr ein Stoff die Quellung fördert, desto leichter wird er diosmieren.

Im folgenden soll durch eine Reihe von Versuchen gezeigt werden, wie sich Äthylalkohol den Zellen des Weizenkorns gegenüber (als Vertreter eines mehrzelligen Körpers) und gegen die einzelligen Sporen von *Tilletia tritici* verhält. Letztere sind deshalb von Interesse, weil von ihnen die Ansteckung der jungen Weizenpflanzen ausgeht (Weizensteinbrand) und auf dem verschiedenartigen Verhalten von Weizen- und Sporenzellen die Wirkung der sogenannten Beizmittel (6) beruht.

Davon ausgehend, daß oberflächenaktive Stoffe den oberflächeninaktiven Stoffen den Eintritt in die Zellen erleichtern, wurden die Alkohole mit Sublimat, einem Vertreter der Beizmittel, kombiniert.

Quellungsversuche sollten außerdem einen Einblick in den Vorgang der Quellung geben.

Während die erwähnten Versuche einen allgemeinen Einblick in die Wirkungsweise oberflächenaktiver Stoffe auf Korn und Brandsporen gewährten, sollte die Untersuchung bekannter Beizmittel zeigen, inwiefern die Praxis von diesen physikalisch-chemischen Vorgängen Gebrauch gemacht hat.

I. Einfluß von Äthylalkohol auf das Weizenkorn (Hohenheimer Diekkopf) und Sporen von *Tilletia tritici*.

Um den Einfluß von Äthylalkohol auf das Weizenkorn kennenzulernen, ließ man Lösungen dieses Alkohols in verschiedenen Konzentrationen und bei verschiedener Oberflächenspannung (Messung der Steighöhe, Tabelle I) 1 Stunde lang auf 100 g Weizenkörner einwirken.

Tabelle I.

Oberflächenspannung und C_2H_5OH -Lösungen.

Es wurde mit dem Traubeschen Stalagmometer die Steighöhe (= *S*) gemessen.

Nr.	C_2H_5OH	<i>S</i>	Nr.	C_2H_5OH	<i>S</i>
1	0	113,3	5	60	47,0
2	5	87,3	6	80	45,5
3	20	64,0	7	96	44,0
4	40	52,0			

Man trennte durch Absaugen auf einer Nutsche die Weizenkörner von den Lösungen und trocknete auf Filtrierpapier bei Zimmertemperatur. Die getrockneten Körner brachte man zur Keimung in Triebkraftschalen (8). Als Triebkraftschalen dienen Tonschalen (mit glasiertem Untersatz) von gleichen Ausmaßen. Man nahm für die Versuche Schalen von annähernd gleicher Wasserkapazität. Die Schalen wurden 7 cm hoch mit gesiebttem Ziegelgrus gefüllt, ein 3 cm hohes Kreuz eingelegt, das die Oberfläche in vier gleiche Felder teilte. In jedes Feld kamen 25 oder 50 Körner. Die Körner wurden so eingelegt, daß sie gleichen Abstand voneinander hatten. Nach dem Einlegen füllte man die vier Felder mit Ziegelgrus so, daß mit der Oberseite der Kreuze eine Ebene gebildet wurde. Die Verteilung der Versuchsnummern auf die vier Felder einer Tonschale geschah nach folgendem Schema: Hatte man z. B. sechs Weizenproben mit den Nummern 1 bis 6, so kamen

in Schale I Nr. 1, 2, 3, Unbehandelt,
 „ „ II „ 4, 5, 6, „
 „ „ III „ 1, 2, 3, „ usf.

(mindestens drei Wiederholungen, bei 25 Körnern pro Feld sechs Wiederholungen). Jede Schale erhielt 80 % der Wasserkapazität des eingefüllten Ziegelgruses und 80 % der Wasserkapazität der Schale. Das Gewicht der Schalen wurde täglich kontrolliert. Die Triebkraft und Triebenergie erhielt man durch Auszählen der Keimlinge nach 7 bis 14 Tagen. Das Keim-

gewicht nach 14 Tagen wurde in der Weise bestimmt, daß man den Ziegelgrus von den Keimlingen mit dem Pinsel entfernte, dieselben unmittelbar am Kornrest abschnitt und wog. Gleichmäßiges Arbeiten ist dabei erforderlich, um brauchbare Resultate zu erhalten. Zum leichteren Vergleich der Ergebnisse sind in den Tabellen die Durchschnittszahlen der Triebkraftversuche umgerechnet worden auf „Unbehandelt“ = 100 und ein Keimgewicht von „Unbehandelt“ = 10 g.

Aus Tabelle II, Abb. 1 ergibt sich der Einfluß von Äthylalkohol auf Triebkraft und Keimgewicht des Weizens.

Tabelle II.

Einfluß von Äthylalkohol in verschiedenen Konzentrationen auf die Triebkraft und das Keimgewicht von Hohenheimer Dickkopfweizen.

Nr.	C ₂ H ₅ OH %	Triebkraft nach Tagen						Keimgewicht
		7	8	9	10	12	14	
1	1	75	76	80	97	102	102	10,2
2	5	90	85	92	102	102	102	10,4
3	20	29	33	41	53	55	55	4,6
4	40	0	0	0	0	0	0	0
5	60	0	0	0	0	0	0	0
6	80	5	14	19	24	24	34	1,6
7	96	29	48	54	65	65	65	6,0
8	unbehandelt	77	83	86	96	100	100	10,0

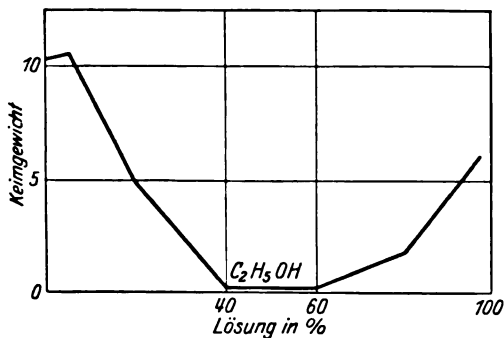


Abb. 1.

Bei Anwendung von Äthylalkohol fallen anfangs die Triebkraftzahlen mit zunehmender Konzentration, erreichen bei etwa 40 % Äthylalkohol ein Minimum (Keimgewicht = 0) und steigen bei Konzentrationen über 60 % wieder an (Keimgewicht 1,6, 6,0).

Das Auftreten eines Keimungsminimums bei Anwendung von 40%igem Äthylalkohol widerspricht der stetig bis zu den höchsten Konzentrationen zunehmenden Erniedrigung der Oberflächenspannung (s. Tabelle 1). Man sollte erwarten, daß die schädigende Wirkung des

Alkohols ständig zunimmt und nicht nach Überschreitung einer gewissen Konzentration wieder abnimmt. Im folgenden wurde nach einer Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch gesucht.

Das Weizenkorn besteht vorwiegend aus Eiweißstoffen und Stärke. Eiweißstoffe sind die Hauptbestandteile des Keimlings, Stärke der Hauptbestandteil des Mehlkörpers. Wenn Alkohole die Keimung des Kornes aufheben, so erleiden die genannten kolloiden Stoffe (Eiweiß, Stärke) irreversible Zustandsänderungen. Das lebensfähige Korn, welches man sich aus verschiedenen Gelen zusammengesetzt denken kann, muß einen gewissen Prozentsatz Wasser = Dispersionsmittel enthalten. Sinkt der Gehalt an Dispersionsmittel unter eine optimale Grenze, so verliert das Korn seine Keimfähigkeit, das reversible Gel geht in den irreversiblen Zustand über, ein Vorgang, der bei langjähriger trockener Lagerung von selbst eintreten kann. Entzug von Dispersionsmittel ist auch notwendig, wenn man eine kolloide Lösung in ein Gel umwandeln will und insofern als man beim Gel wiederum durch Wasserentzug den irreversiblen Zustand, den Gelzustand herbeiführen kann, kann man das Gel auch als eine höchst konzentrierte Lösung auffassen und irreversible Veränderungen, wie sie durch Äthylalkohol hervorgerufen werden, als Fällungserscheinungen betrachten. Die Fällungswirkung der Alkohole ist in den niederen Konzentrationen geringer als in den höheren. Um die Keimkraft des Kornes aufzuheben, müssen sie bis zu einer gewissen Tiefe eindringen. Diese Tiefenwirkung kann bei den höchsten Alkoholkonzentrationen dadurch verringert werden, daß vermöge der stärksten Fällungskraft bereits in den äußeren Kornschichten so dichte Fällungszonen entstehen, daß ein Tiefer-eindringen des Alkohols verhindert wird. Auf diese Weise könnte das Auftreten eines Keimungsminimums bei Anwendung von 40%iger Äthylalkohollösung verständlich werden.

Es bleibt dann allerdings noch zu erklären, wie es dem Wasser mit seinem geringeren Permeierungsvermögen beim Keimungsvorgang (z. B. Tabelle II) möglich ist, diese dichten Fällungszonen zu durchdringen. Würde das Wasser nur kurze Zeit auf das Korn einwirken, so wäre ihm der Weg ins Innere des Kornes versperrt. Die Keimung erfordert aber eine ganze Reihe von Tagen, die Einwirkung des Wassers erstreckt sich also auf einen verhältnismäßig sehr langen Zeitraum, der es ermöglicht, die Zwischenräume der Fällungszonen zu lockern und die tiefer liegenden nur wenig veränderten Kolloide zum Quellen zu bringen.

Während man aus den angeführten Versuchen den Einfluß des Äthylalkohols auf das mehrzellige Weizenkorn kennenlernte, wird in Tabelle III die Wirkung auf die Brandsporen gezeigt.

Tabelle III.

Einfluß von Äthylalkohol in verschiedenen Konzentrationen auf die Keimung von Brandsporen.

Nr.	C ₂ H ₅ OH %	Keimung der Brandsporen nach Tagen						
		4	5	6	7	9	10	12
1	4	1	2	3	4	4	4	4
2	8	1	2	3	4	4	4	4
3	16	1	2	3	4	4	4	4
4	20	1	2	4	4	4	4	4
5	40	0	0	0	0	0	0	0
6	60	0	0	0	0	0	0	0
7	80	1	1	1	1	2	2	2
8	96	1	1	2	2	3	4	4
9	unbehandelt	3	4	4	4	4	4	4

Die Brandsporen wurden allgemein eine Stunde mit den Lösungen behandelt, filtriert und mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen, um eine Nachwirkung beim Trocknen auszuschalten. Die Sporen kamen nach der Erdmethode (11) zur Aussaat. Die erste Beobachtung erfolgte 4 Tage, die letzte 12 Tage nach Aussaat. Die Zahlen in den Tabellen bedeuten:

- 0 = keine gekeimten Sporen,
- 1 = vereinzelte Keimung,
- 2 = mäßige Keimung,
- 3 = zahlreiche Keimung,
- 4 = sehr zahlreiche Keimung.

Äthylalkohol (s. Tabelle III) verhindert in etwa 40 %iger Lösung die Sporenkeimung. In 80 %iger und 96 %iger Lösung aber keimen die Sporen teilweise sehr zahlreich. Äthylalkohol zeigt also mit dem Auftreten eines Keimungsminimums bei der Behandlung der Brandsporen das gleiche Verhalten wie beim Korn.

II. Einfluß von Äthylalkohol in Kombination mit Sublimat auf das Weizenkorn und Sporen von *Tilletia tritici*.

Eingangs wurde bereits erwähnt, daß Brandsporen die Ursache für die Ansteckung der Weizenkeimlinge und damit der Bildung der Brandähren sind. Heute noch verursacht der Steinbrand des Weizens großen Schaden. Durch Beizen des Saatgutes kann man die Keimung der am Korn haftenden Sporen verhindern, ohne die Keimung des Korns zu beeinträchtigen (4). Als Beizmittel stehen zurzeit Präparate im Vordergrund, die Quecksilberverbindungen als wirksamsten Bestandteil enthalten. Um zu untersuchen, in welcher Weise durch Zusatz oberflächenaktiver Stoffe zu Beizlösungen die Beizwirkung beeinflußt werden kann, kombinierte man Sublimatlösungen (als einfachste quecksilberhaltige Beizlösung) mit Äthylalkohol.

Aus Tabelle IV, Abb. 2 ist die Wirkung des Sublimats allein auf die Triebkraft und das Keimgewicht des Weizens zu entnehmen.

Tabelle IV.

Einfluß von Sublimat in verschiedenen Konzentrationen auf die Triebkraft und das Keimgewicht von Hohenheimer Dickkopfweizen.

Nr.	Sublimat ‰ Hg	Triebkraft nach Tagen							Keim- gewicht
		7	8	9	10	11	12	14	
1	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,3	0	0	0	0	0	0	9	0,7
4	0,2	0	0	7	16	25	41	44	2,2
5	0,1	0	67	92	92	99	106	108	8,9
6	0,06	5	46	100	110	115	115	115	11,8
7	0,04	1	92	100	100	106	106	108	12,0
8	0,01	60	104	104	106	106	107	107	10,8
9	unbehandelt	74	82	90	94	97	97	100	10,0

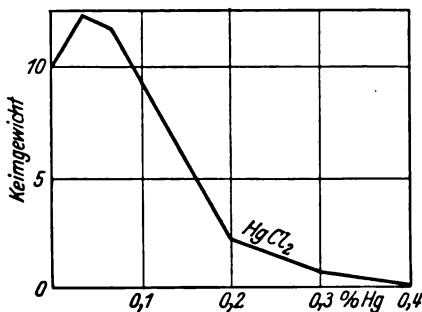


Abb. 2.

0,1 %ige und höherprozentige Quecksilberlösungen verursachen eine zunehmende Schädigung des Korns. Bei den Konzentrationen 0,01 bis 0,06 % Quecksilber liegen Triebkraft und Keimgewicht höher als unbehandelt, worin eine Reizwirkung (9) (Stimulation) durch Quecksilber zum Ausdruck kommt. Reizwirkung und Schädigung zeigt auch der Verlauf der Kurve in Abb. 2.

Durch die Kombination von Quecksilber mit Äthylalkohol könnte theoretisch das Keimgewicht in verschiedener Weise beeinflusst werden. Zieht man ein Zurückdrängen der Ionisation in Betracht, so würde die Giftwirkung sich nicht erhöhen, sondern sie würde abgeschwächt werden. Es wäre andererseits auch möglich, daß durch das leichte Eindringen des Alkohols in die Zellen der Angriff des Sublimats erleichtert, die Giftwirkung verstärkt wird.

Aus Tabelle V ergibt sich, daß das Keimungsminimum für die Kombination $C_2H_5OH + Hg$ (0,01 bis 0,1 %) bei Zusatz von etwa 40 % C_2H_5OH beginnt und bei Zusatz von 60 % C_2H_5OH endet. Man erhält also für das Keimungsminimum die gleichen Konzentrationen, wie die Keimgewichte von C_2H_5OH allein ergaben. Bei höheren Konzentrationen verschiebt sich der Beginn des Keimungsminimums immer mehr nach links, d. h. es beginnt in immer niedrigeren Alkoholkonzentrationen. Die Keimgewichtszahlen nehmen nicht den niedersten

Wert an, den Quecksilberlösung oder Äthylalkohollösung für sich allein ergaben, sondern sie sinken unter die Werte der Kombinationsfaktoren. Der Zusatz von Äthylalkohol zu Sublimatlösungen erhöht also die Giftwirkung (mit Ausnahme bei der Kombination 0,01 % Quecksilber + Alkohol in verschiedenen Konzentrationen).

Tabelle V.

Äthylalkohol und Sublimatlösungen.

Einfluß auf das Keimgewicht.

(Die Zahlen geben die Keimgewichte nach 14 Tagen an.)

Nr.	Sublimat- lösung ‰ Hg	Bei Zusatz von C ₂ H ₅ OH in Lösungen von ‰ C ₂ H ₅ OH							
		0	1	5	20	40	60	80	99
	0	—	10,2	10,4	4,6	0	0	1,6	6,0
1	0,5	0	0	0	0	0	0	0	5,2
2	0,3	0,7	0	0	0	0	0	0	9,6
3	0,2	2,2	0,1	0	0	0	0	0,8	7,2
4	0,1	8,9	2,7	2,6	1,0	0	0	3,6	7,4
5	0,06	11,8	7,1	6,8	3,8	0	0	3,6	8,4
6	0,01	10,8	12,7	9,6	8,4	0	0	3,8	7,4
7	unbehandelt	10,0	—	—	—	—	—	—	10,0

Tabelle VI.

Äthylalkohol und Sublimatlösungen.

Einfluß auf die Keimung der Brandsporen.

(Die Zahlen geben die Keimung der Brandsporen nach 12 Tagen an.)

Nr.	Sublimat- lösung ‰ Hg	Bei Zusatz von C ₂ H ₅ OH in Lösungen von ‰ C ₂ H ₅ OH								
		0	4	8	16	20	40	60	80	96
	0	—	4	4	4	4	0	0	4	4
1	0,02	0	0	0	0	0	—	—	—	—
2	0,01	0	0	0	0	0	—	—	—	—
3	0,0075	0	0	1	0	0	—	—	—	—
4	0,005	1	1	1	1	2	0	0	4	4
5	0,004	2	—	—	2	2	0	0	4	4
6	0,003	2	—	—	2	2	0	0	4	4
7	0,002	3	—	—	4	4	0	0	4	4
8	0,001	4	—	—	4	4	0	0	4	4
9	0,0005	4	—	—	4	4	0	0	4	4
10	unbehand.	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Im Gegensatz zum Weizenkorn konnte bei Brandsporen keine verstärkte Wirkung durch die Kombination Alkohol + Sublimat erzielt werden.

III. Einfluß von Äthylalkohol auf die Quellung des Weizens.

Die vorausgehenden Untersuchungen gaben bereits Veranlassung, Quellungs- bzw. Entquellungsvorgänge zur Deutung von Zustands-

änderungen des Korns heranzuziehen. Quellungsversuche sollen im folgenden den Einfluß von Alkohol auf die Quellung näher kennzeichnen.

Bei derartigen Versuchen bringt man im allgemeinen den quellfähigen Stoff in einen Überschuß der Lösung, trennt ihn von der Lösung und bestimmt nach oberflächlichem Trocknen das Gewicht. Um diese Methode zunächst bei unbehandeltem Weizen auszuprobieren, brachte man je 25 g bei Zimmertemperatur in je 100 ccm Wasser. Zum Vergleich legte man (wie bei der Keimprüfung) je 25 g Weizen in feuchtes Filtrierpapier, bei welchem das Wasser im Gegensatz zum ersten Versuch nur in beschränkter Menge geboten wird. Nach gewissen Zeitabständen saugte man das Wasser auf einer Nutsche ab, trocknete mit Filtrierpapier und bestimmte die Wasseraufnahme.

Die Wasseraufnahme des Weizens aus 100 ccm Wasser und aus feuchtem Filtrierpapier ergibt sich aus Tabelle VII, Abb. 3 (Kurve I zeigt die Wasseraufnahme des Weizens in feuchtem Filtrierpapier, Kurve II die Wasseraufnahme in 100 ccm Wasser).

Tabelle VII.

Einfluß des Wassers auf die Quellung des Weizens.

(Nr. 1 bis 3 = Quellung in feuchtem Filtrierpapier, Nr. 4 bis 6 Quellung in 100 ccm Wasser, D = Durchschnitt, R = w. Schwankung.)

Nr.	Aufgenommene Menge Wasser in g nach Stunden						
	13½	21½	35	45	62	83	131
1	4.29	5.51	7.17	8.14	—	—	—
2	4.67	5.74	7.42	8.80	10.35	12.46	20.48
3	4.51	5.76	7.44	8.72	10.22	12.50	20.74
D.	4.49	5.67	7.34	8.55	10.29	12.48	20.61
R.	± 0,08	± 0,06	± 0,07	± 0,17	± 0,05	± 0,02	± 0,11
4	9.25	10.78	12.30	13.25	—	—	—
5	9.29	10.84	12.32	13.43	14.47	15.46	17.36
6	9.26	10.91	12.45	13.42	14.67	15.56	17.90
D.	9.27	10.84	12.35	13.36	14.57	15.51	17.63
R.	± 0,01	± 0,03	± 0,03	± 0,05	± 0,08	± 0,04	± 0,22

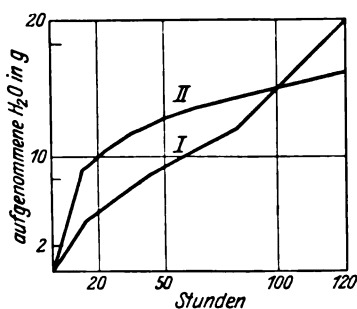


Abb. 3.

Aus den Zahlen ist zu erkennen, daß der Weizen anfangs in 100 ccm Wasser annähernd doppelt soviel Wasser aufnimmt als in feuchtem Filtrierpapier. Wie auch die Kurven zeigen, ist die Wasseraufnahme in den ersten Stunden am größten. Nach 13½ Stunden ist sie eine gleichmäßige, die beiden Kurven (I und II Abb. 3) laufen fast parallel bis etwa 50 Stunden; nach 50 Stunden

verlangsamt sich in 100 ccm Wasser die Wasseraufnahme immer mehr, ein Zeichen dafür, daß der Quellungsvorgang durch die Entquellung, einen Lösungsvorgang, allmählich abgelöst wird. Es kann also der Quellungsversuch in überschüssigem Wasser nur bis etwa 50 Stunden ausgedehnt werden. In Filtrierpapier dagegen beginnt nach 50 Stunden der Weizen zu keimen und damit der Wasserbedarf sich zu steigern, was auch aus dem starken Ansteigen der Kurve I Abb. 3 zu erkennen ist. Nach 50 Stunden wurden die sich entwickelnden Keimlinge und Wurzeln mitgewogen, trotzdem wird man den Versuch als Quellungsversuch ansehen dürfen, da andere Wachstumsfaktoren außer denen, die in Zusammenhang mit den Vorratsstoffen des Korns stehen, für diese Zeiten fast nicht in Betracht kommen. Nach 45 Stunden hatte der Weizen in Filtrierpapier 8,55 g, in 100 ccm Wasser 13,43 g aufgenommen.

Da bei den Quellungsversuchen mit Alkohol die Einhaltung möglichst natürlicher Versuchsbedingungen geboten erschien, war die Frage zu klären, ob mit vermehrter Wasseraufnahme auch in späteren Keimungsstadien des Korns, z. B. nach 14 Tagen, eine erhöhte Gewichtszunahme der Pflanzen verbunden ist. Um dies festzustellen, wurde der Versuch Nr. 1 Tabelle VII (Quellung von 25 g Weizen in Filtrierpapier) und Nr. 4 (Quellung in 100 ccm Wasser) nach 45 Stunden unterbrochen und mit diesen Weizenproben in Tierbkräftschalen Triebkraftversuche angelegt. Nach 14 Tagen bestimmte man wie üblich das Keimgewicht. Es wurde folgendes gefunden:

1. Weizen aus Probe Nr. 1 Tabelle VII (mit 8,14 g Wasser nach 45 Stunden).

Triebkraftversuch	a)	Keimgewicht =	15,9
	b)	„	= 15,9
	c)	„	= 15,9

2. Weizenprobe Nr. 4 Tabelle VII (mit 13,25 g Wasser nach 45 Stunden).

Triebkraftversuch	a)	Keimgewicht =	16,0
	b)	„	= 16,0
	c)	„	= 16,6

Man sieht, daß die Pflanzen beider Weizenproben nach 14 Tagen ihr Gewicht fast vollkommen ausgeglichen haben, daß also die vermehrte Wasseraufnahme im Anfangsstadium des Keimens kein vermehrtes Erntegewicht nach 14 Tagen zur Folge hat.

Danach schien es, daß die Versuche mit Alkohol in überschüssiger Flüssigkeit durchgeführt werden können. Man behandelte je 25 g Weizen mit verschiedenen Konzentrationen von Äthylalkohol (1 bis 96 %)

eine Stunde lang, trocknete, legte je 25 g Weizen in 100 ccm Wasser. Es ergab sich, daß alle Versuchsproben nach 50 Stunden fast gleich viel Wasser aufgenommen hatten, daß bei der Quellung in Wasser die Vorbehandlung mit Alkohol überhaupt nicht zur Geltung kam. Es mag sich dies vor allem daraus erklären lassen, daß Schädigungen des Korns in erster Linie den Keimling treffen. Das Gewicht des Keimlings beträgt nur etwa 2 bis 3 % des ganzen Korngewichts, die Hauptmasse nimmt der überwiegend aus Stärke bestehende Mehlkörper ein. Wenn daher der Mehlkörper bis zur optimalen Grenze Wasser aufnimmt, so kann eine etwaige geringere Wasseraufnahme des Keimlings im Gewicht kaum in Erscheinung treten. Es können u. a. auch kolloid-chemische Vorgänge eine Rolle spielen insofern, als die Eiweißstoffe des Keimlings geringere Quellungsgeschwindigkeit besitzen als die Stärke des Mehlkörpers. Über 50 Stunden kann der Quellungsversuch (s. Seite 125) nicht ausgedehnt werden, man mußte sich deshalb zu einem Versuch in feuchtem Filtrierpapier entschließen. Es wurden wieder je 25 g Weizen mit verschiedenen Alkoholkonzentrationen eine Stunde lang behandelt und der getrocknete Weizen in feuchtes Filtrierpapier gelegt. Nach gewissen Zeiten bestimmte man die Wasseraufnahme. Zum Vergleich wurden 25 g Weizen eine Stunde in Wasser vorbehandelt, weitere 25 g nicht mit Wasser behandelt und ebenfalls in feuchtes Filtrierpapier gelegt. Aus Tabelle VIII ergibt sich, daß auch in feuchtem Filtrierpapier nach 69 Stunden noch keine nennenswerten Unterschiede in der Wasseraufnahme zu bemerken sind. Erst nach 93 Stunden, noch deutlicher nach 147 Stunden kommt die verschiedene Vorbehandlung zur Geltung. Nach 147 Stunden hatte der mit 1%iger Äthylalkohollösung vorbehandelte Weizen 18,06 g Wasser aufgenommen, der nur mit Wasser vorbehandelte 17,58 g und der unbehandelte Weizen (Nr. 7 Tabelle VIII) nur 11,66 g.

Tabelle VIII.

Einfluß von Äthylalkohol auf die Quellung des Weizens.
(Quellung in feuchtem Filtrierpapier, D.)

Nr.	C ₂ O ₅ CH %	Aufgenommene Menge Wasser in g nach Stunden				
		4	23	69	93	147
1	1	1,99	5,46	8,76	10,83	18,06
2	10	1,91	5,31	8,36	10,07	15,93
3	20	1,71	5,12	8,04	9,97	15,23
4	50	1,87	5,38	8,62	9,67	10,83
5	96	1,69	5,42	8,58	10,02	14,05
6	unbeh., 1 Std. mit Wasser behandelt	1,97	5,06	8,31	10,26	17,58
7	unbeh., nicht mit Wasser behandelt	1,46	4,39	8,14	9,33	11,66

Bei Anwendung höherer Alkoholkonzentrationen sinkt die Wasseraufnahme immer mehr und erreicht bei Anwendung 50 %iger Alkohollösung ähnlich wie bei den Triebkraft- und Keimgewichtsbestimmungen ein Minimum (10,83 g).

Aus den vorliegenden Quellungsversuchen ist ersichtlich, daß Schädigungen des Korns bei Behandlung mit Äthylalkohol erst dann in einer verminderten Wasseraufnahme zu erkennen sind, wenn der Keimling sich zu entwickeln und Wurzeln zu treiben begonnen hat. Man darf ferner aus den Versuchen schließen, daß Keimgewichtsbestimmungen nach 14 Tagen, bei welchen das Wurzelgewicht nicht berücksichtigt wird, ein durchaus richtiges Bild über verschiedene Zustandsänderungen des Weizenkornes zu geben imstande sind. Die Quellungsversuche mit Äthylalkohol stehen im Einklang mit früher gewonnenen Resultaten.

IV. Beizmittel und oberflächenaktive Stoffe.

Man hat gefunden, daß Äthylalkohol in Kombination mit Quecksilberlösungen imstande ist, die Wirkung des Quecksilbers zu erhöhen, indem er vermöge seiner Oberflächenaktivität das Eindringen des Quecksilbers erleichtert. Die Beobachtungen wurden in so hohen Konzentrationen gemacht, wie sie in der Praxis bei Anwendung gebrauchsfertiger Beizlösungen kaum vorkommen. Alkohol verhält sich in bezug auf Reaktionsfähigkeit ziemlich indifferent. Man kann sich aber vorstellen, daß ein und dieselbe Verbindung (z. B. eine organische Quecksilberverbindung) die neben großer Reaktionsfähigkeit (Giftwirkung) noch Oberflächenaktivität besitzt, bereits in sehr niedrigen Konzentrationen ähnliche Wirkungen hervorruft, wie Alkohol in höheren, und es kann deshalb der Einfluß der hohen Konzentrationen mit seinen großen Ausschlägen bis zu einem gewissen Grade auch für die Beurteilung der niederen Konzentrationen oberflächenaktiver Giftstoffe herangezogen werden. Untersucht man nach dieser Richtung die modernen Beizmittel zur Bekämpfung der Getreidekrankheiten (wie Weizensteinbrand, Haferflugbrand, Roggenfusarium, Gerstenstreifenkrankheit usw.) so findet man folgendes:

Allgemein ist über die Beizmittel zu erwähnen, daß die quecksilberhaltigen Beizmittel die älteren, wie Formaldehyd, mehr oder weniger verdrängt haben, weil sie insbesondere neben guter Wirkung auf die Keimungshemmung der Brandsporen große Unschädlichkeit (auch bei unvorsichtiger Überschreitung der Gebrauchskonzentration) in bezug auf das Saatgut in sich vereinen.

Es wurden Lösungen einer Reihe von bekannten Beizmitteln mit dem Traubeschen Stalagmometer gemessen. Man fand, daß Form-

aldehyd (s. Tabelle IX) bereits in der Konzentration, wie sie für die Praxis üblich ist (= 0,1 %ig), die Oberflächenspannung des Wassers erniedrigt. (Die konzentrierte 40 %ige Formaldehydlösung enthält immer einen gewissen Prozentsatz von Methylalkohol, etwa 12 %, welcher die Bildung von Paraformaldehyd verhüten soll. Dem Gehalt an Methylalkohol ist aber nur ein Bruchteil der gemessenen Steighöhe zuzuschreiben.

Tabelle IX.

Oberflächenspannung und Formaldehydlösungen.

(Es wurde die Steighöhe = S gemessen.)

Nr.	HCOH-Lösung %	S	Nr.	HCOH-Lösung %	S
0	Wasser	113	5	0,4	111,0
1	0,02	113	6	1,0	109,3
2	0,04	113	7	5,0	99,7
3	0,1	112,7	8	10,0	91,7
4	0,2	112,3	9	40,0	66,2

Tabelle X.

Oberflächenspannung und Lösungen von Segetan-Neu.

(Es wurde die Steighöhe = S gemessen.)

Nr.	Segetan-Neu %	S	Nr.	Segetan-Neu %	S
0	Wasser	113	4	1,0	100
1	0,1	99	5	5,0	100,3
2	0,2	99,3	6	20,0	107
3	0,4	99,7	7	100,0	89

Unter den quecksilberhaltigen Mitteln wurde nur ein (flüssiges) Präparat gefunden, welches die Oberflächenspannung des Wassers erniedrigt Segetan-Neu (s. Tabelle X).

(Die chemische Zusammensetzung von Segetan-Neu ist uns nicht bekannt, deshalb kann auch keine Erklärung dafür gegeben werden, daß niedrigere Segetan-Konzentrationen die Oberflächenspannung des Wassers mehr erniedrigen als höhere. Jedenfalls liegt hier kein einheitlicher Stoff, sondern eine Mischung von Stoffen vor.)

Segetan-Neu erniedrigt ebenfalls bereits in der für die Praxis üblichen Konzentration (0,1 %ige) die Oberflächenspannung des Wassers.

Nach den in Teil I und II gemachten Erfahrungen müßten die beiden Beizmittel Formaldehyd und Segetan-Neu vermöge ihrer Oberflächenaktivität tiefer in das Weizenkorn eindringen als Beizmittel, welche die Oberflächenspannung des Wassers nicht erniedrigen. Die Gefahr der Schädigung der Keim- und Triebkraft wäre daher bei den erstgenannten Beizmitteln eine größere.

Tabelle XI.

Einfluß verschiedener Beizmittel auf die Triebkraft und das Keimgewicht.

Mittel	Triebkraft nach Tagen							Keim- gewicht
	7	8	9	10	11	12	14	
A. Beizmittel, welche die Oberflächenspannung des Wassers erniedrigen.								
1. Formaldehyd.								
a) 0.1 %ig	52	66	69	73	75	78	79	6,4
b) 0.2 %ig	36	49	59	60	61	61	62	4,9
c) 0.4 %ig	—	—	9	11	11	11	12	0,7
Unbehandelt	83	90	96	97	100	100	100	10,0
2. Segetan-Neu.								
a) 0.1 %ig	79	89	93	99	99	112	112	8,1
b) 0.2 %ig	85	93	98	101	103	103	105	6,6
c) 0.4 %ig	51	68	79	82	85	90	90	5,1
Unbehandelt	83	90	96	97	100	100	100	10,0
B. Beizmittel, welche die Oberflächenspannung des Wassers <i>nicht</i> erniedrigen.								
1. Germisan.								
a) 0.25 %ig	101	102	102	104	104	104	105	10,5
b) 0.5 %ig	68	94	98	100	101	101	101	11,0
c) 1.0 %ig	20	72	95	98	98	98	101	8,9
Unbehandelt	83	90	96	97	100	100	100	10,0
2. Urania-Beize								
a) 0.25 %ig	96	101	103	103	107	107	108	10,5
b) 0.5 %ig	105	105	105	105	107	107	107	12,0
c) 1.0 %ig	99	101	103	105	109	109	112	10,1
Unbehandelt	83	90	96	97	100	100	100	10,0
3. Uspulun.								
a) 0.5 %ig	83	99	102	102	105	105	108	12,9
b) 1.0 %ig	89	103	105	106	108	108	108	11,9
c) 2.0 %ig	55	79	95	98	100	100	108	11,3
Unbehandelt	83	90	96	97	100	100	100	10,0
4. Höchst. Univ.-Bz.								
a) 0.25 %ig	77	92	103	120	120	120	120	10,4
b) 0.5 %ig	69	78	100	108	118	123	125	10,7
c) 1.0 %ig	20	27	49	67	84	105	110	7,9
Unbehandelt	83	90	96	97	100	100	100	10,0
5. Agfa-Saatbeize.								
a) 0.25 %ig	76	85	99	102	104	104	104	10,5
b) 0.5 %ig	29	69	87	93	95	99	103	8,8
c) 1.0 %ig	1	29	62	73	85	90	95	7,5
Unbehandelt	83	90	96	97	100	100	100	10,0

Um dies festzustellen, prüfte man Triebkraft und Keimgewicht von Hohenheimer Dickkopfweizen bei Behandlung des Korns

A. mit Formaldehyd und Segetan-Neu,

B. mit Beizmitteln, welche die Oberflächenspannung des Wassers nicht erniedrigen (s. Tabelle XI).

Die Versuche wurden in drei Konzentrationen durchgeführt,

a) in der normalen Gebrauchskonzentration, b) in der zweifachen

Gebrauchskonzentration, c) in der vierfachen Gebrauchskonzentration, um zu sehen, welche Sicherheit die einzelnen Mittel gegen etwaige Überschreitung der normalen Konzentration bieten. Die Versuchsergebnisse wurden wiederum auf eine Triebkraft „Unbehandelt“ = 100

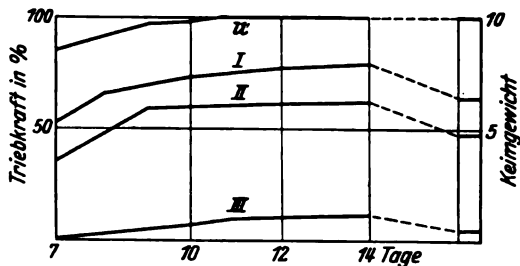


Abb. 4. Formaldehyd.

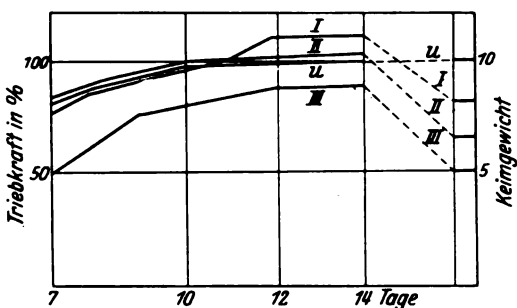


Abb. 5. Segetan Neu.

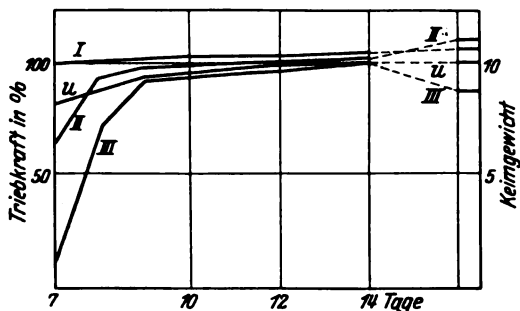


Abb. 6. Germisan.

und ein Keimgewicht „Unbehandelt“ = 10 umgerechnet. Die Versuchsergebnisse der Tabelle XI kamen gleichzeitig graphisch in Abb. 4 bis 10 zur Darstellung. Die Kurven zeigen Triebenergie und Triebkraft nach 14 Tagen. Die Endpunkte für die Triebkraft nach 14 Tagen wurden mit einer Säule verbunden (punktierter Linie), auf welcher

das Keimgewicht zum Ausdruck kommt. Dabei wurde die Triebkraft von Unbehandelt = 100 auf gleicher Höhe mit dem Keimgewicht von Unbehandelt = 10 angenommen.

Insbesondere die Zeichnungen lassen klar erkennen, daß die Schädigungen des Korns bei Anwendung von Formaldehyd und Segetan-Neu größer sind als bei Germisan, Uraniabeize, Uspulun, Universalbeize, Höchst und Agfa-Saatbeize (das Resultat kann durch Feldversuche belegt werden).

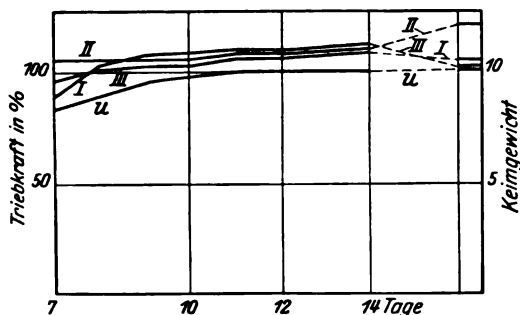


Abb. 7. Uraniabeize (Hohenheimer Beize).

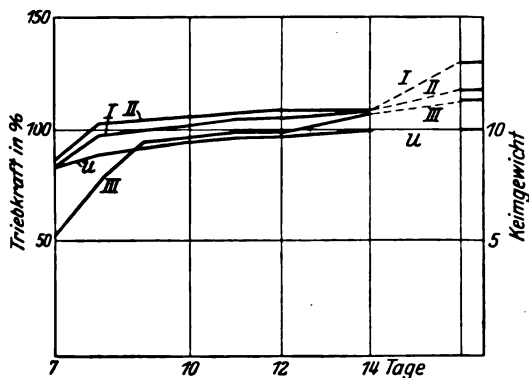


Abb. 8. Uspulun.

Bemerkenswert ist bei Segetan-Neu, daß die Triebkraftzahlen teilweise höher als Unbehandelt liegen, während die Keimgewichte auch in der normalen Gebrauchskonzentration niedriger als Unbehandelt sind. Formaldehyd schädigt bereits in normaler Gebrauchskonzentration. (Es kommt hier gleichzeitig eine Wirkung der Lagerung zum Ausdruck, da die Triebkraftversuche erst einige Zeit nach dem Beizen des Weizens angelegt werden konnten.) Germisan, Uraniabeize und Uspulun ergeben auch bei vierfacher Überschreitung der normalen Gebrauchskonzentration keine nennenswerte Schädigung. Universal-

beize Höchst schädigt nur bei Anwendung der vierfachen, Agfa-Saatbeize bei Anwendung der zwei- und vierfachen Konzentration. Übereinstimmend sind aber bei der zweiten Gruppe der Beizmittel Triebkraft- und Keimgewichtszahlen der normalen Gebrauchskonzentration höher als Unbehandelt.

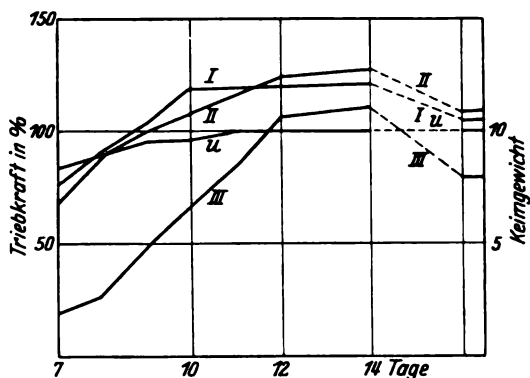


Abb. 9. Universalbeize Höchst.

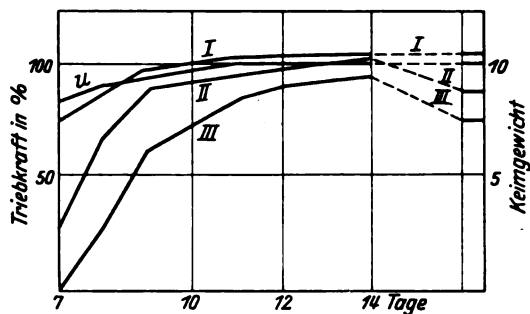


Abb. 10. Agfa Saatbeize.

Wenn daher bei den Beizmittelversuchen der direkte Nachweis nicht geführt wurde, bis zu welchem Grade die Oberflächenaktivität an der Erniedrigung des Keimgewichts beteiligt ist, so wird man doch in Analogie mit früheren Versuchen die Beteiligung der Oberflächenaktivität an der Schädigung des Korns als naheliegend bezeichnen können.

Zusammenfassung.

Bei Einwirkung oberflächenaktiver Alkohole (Methyl- und Äthylalkohol) allein auf das Weizenkorn wird in höheren Konzentrationen die Keim- und Triebkraft vernichtet. Die Schädigung steigert sich nicht entsprechend der zunehmenden Oberflächenaktivität der Alkohole, sondern bei Anwendung von 40. (bis 60.-) %igem Äthylalkohol entsteht

ein Keimungsminimum, für das man eine Erklärung suchte in dichteren Fällungszonen, die ein Tiefer-Eindringen des konzentrierteren Alkohols verhindern. Das beim Korn beobachtete Keimungsminimum kommt bei Brandsporen nur bei Einwirkung von Äthylalkohol zur Geltung.

Läßt man Äthylalkohol gleichzeitig mit Sublimat auf das Korn einwirken, so erleichtert der oberflächenaktive Alkohol das Eindringen des Quecksilbers in die Kornzellen, wodurch eine Erhöhung der Giftwirkung erzielt wird. Die Keimungsminima traten bei den gleichen Konzentrationen auf wie bei den mit Äthylalkohol allein durchgeführten Versuchen.

Quellungsversuche ergaben, daß das Korn etwa in den ersten 50 Stunden je nach der gebotenen Wassermenge das Wasser sehr verschieden aufnimmt. Der größeren Wasseraufnahme entspricht in späteren Wachstumsstadien (nach 14 Tagen) kein größeres Keimgewicht, sondern die Gewichte gleichen sich weitgehend aus.

Unter den Beizmitteln werden Formaldehyd- und Segetan-Neu-Lösungen als oberflächenaktiv festgestellt. Die Schädigungen des Korns durch die oberflächenaktiven Beizmittel Formaldehyd und Segetan-Neu sind in Übereinstimmung mit erhöhter Giftwirkung größer als diejenigen durch die oberflächeninaktiven Beizmittel Germisan, Urania-Beize, Uspulun, Universalbeize Höchst, Agfa-Saatbeize.

Literatur.

1) Das Resultat der vorliegenden Abhandlung ist teilweise auf der Ausstellung der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft in Stuttgart 1925 zur Darstellung gekommen. — 2) Höber, Physik. Chem. d. Zellen u. Gewebe. — 3) J. W. Gibbs, Thermodynam. Studien, S. 258. Leipzig 1892; J. J. Thomson, Applications of dynamics to physics and chemistry 191, 251; ferner Emslander und Freundlich, Zeitschr. f. physik. Chem. 49, 317, 1904. — 4) Overton, Vierteljahrsschr. d. Naturforscherges. in Zürich 40, 1, 1895; 44, 88, 1899. — 5) Pflügers Arch. 105, 541 und 559, 1904; ebendasselbst 123, 419, 1908; 153, 276, 1913. Ber. d. Chem. Ges. 42, 86, 1909; John 1, 312, 1909; Somogyi, Intern. Zeitschr. f. phys. Chem. u. Biol. 3, 61, 1916; Boresch, diese Zeitschr. 101, 110, 1919. — 6) Ein Überblick über den derzeitigen Stand der Beizmittel gibt Klages, Zeitschr. f. anorg. Chem. 39, 3, 1926. — 7) Vgl. auch W. W. Lepeschkin, Über phys.-chem. Ursachen des Todes, Biol. Centralbl. 46, 480 bis 492, 1926. — 8) Die Methode lehnt sich an das auch an der Landesanstalt für Pflanzenschutz Hohenheim übliche Verfahren an, einige Änderungen wurden zur Erhöhung der Genauigkeit vorgenommen. — 9) Vgl. Adalbert Becker, Landw. Jahrb. 63, 501. — 10) Die Erdmethode wird besonders empfohlen von Dr. Lang, Landesanstalt für Pflanzenschutz, Hohenheim.

Über das Antitrypsin des normalen Serums.

Von

L. Utkin-Ljubowzow.

(Aus der Abteilung für experimentelle Pathologie und Pharmakologie des Staatlichen Chemo-Pharmazeutischen Forschungsinstituts zu Moskau.)

(Eingegangen am 8. Juli 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die heutigen Ansichten über die Natur des Antitrypsins des normalen Serums können in zwei Gruppen zusammengefaßt werden.

Die erste basiert auf der von *Jobling* (1) und seinen Mitarbeitern vertretenen Theorie der lipoiden Natur des Antitrypsins, welche anfangs von vielen Forschern angenommen wurde. Diese durch ihre Einfachheit so anziehende Theorie konnte jedoch einer ernsten experimentellen Prüfung nicht standhalten, verlor allmählich ihre Bedeutung und findet zurzeit nur wenig Anhänger. Trotzdem hat sie ihre nicht unbedeutende Rolle in der Erforschung der Natur des Antitrypsins gehabt, da die zur Kontrolle dieser Theorie aufgestellten Untersuchungen die Bearbeitung dieser Frage bedeutend vorwärts brachten. Der andere Standpunkt schreibt dem Antitrypsin eine Eiweißnatur zu und betrachtet die antitryptische Wirkung des Serums als eine Eigenschaft seiner Eiweißstoffe und erklärt diese Wirkung durch ihren hohen Hydratations- und Dispersitätsgrad [*Schierge* (2)]. Von diesem Standpunkt aus verankert (adsorbiert) das Serumweiß (Albumin) das Trypsin, demgegenüber es ziemlich resistent ist, und verhindert, ohne selbst gespalten zu werden, die Wirkung des Ferments. *Hedin* (3), welcher als erster die Bedingungen der Bindung des Trypsins mit dem Serum ausführlich untersucht hat, wies auf eine Ähnlichkeit dieser Erscheinung mit derjenigen der Adsorption hin. Wie bekannt, muß jeder Adsorbent eine stark entwickelte Oberfläche haben, das Serumalbumin aber, mit seinem hohen Dispersitätsgrad, müßte gerade so eine Oberfläche besitzen. Andererseits fand *Schierge*, daß alle Stoffe, welche zur Vernichtung oder Abschwächung der antitryptischen Eigenschaften des Serums angewandt wurden, wie z. B. Chloroform, Aceton usw., zu einer Veränderung des Dispersitätsgrades der Serumproteine nach der Seite seiner Verminderung führen; die damit verbundene Oberflächenverminderung der kolloidalen Teilchen, folglich auch eine Verminderung der Adsorptionsfähigkeit, führt zu einer Schwächung oder einem gänzlichen Verlust der antitryptischen

Eigenschaften. Wir können daraus ersehen, daß die Theorie einer antitryptischen Wirkung des Serumeiweißes, wie es scheint, auf einer festen Basis ruht. Trotzdem besitzt sie einige unklare Punkte. Zuallererst wären vom Standpunkt dieser Theorie die bedeutenden Schwankungen des Antitrypsingehalts im Serum, welche bei verschiedenen Erkrankungen im Organismus beobachtet werden, schwerlich zu erklären; das Blut ist bekanntlich ein sehr stabiles System und zeigt z. B. hinsichtlich der Konzentration der Wasserstoffionen eine bemerkenswerte Konstanz (4), diese muß aber als ein Hauptfaktor betrachtet werden, welcher die Eigenschaften des Eiweißes, folglich auch seine Dispersität bestimmen. Außerdem dürfte diese Theorie schwerlich zur Erklärung solcher Tatsachen dienen, wie die in den Arbeiten von *Stawraky* (5) und *Niskowsky* (6) beschriebenen, wo der Antitrypsingehalt des Serums nach einer Exstirpation der Speicheldrüsen bedeutend sank. *Niskowsky* beobachtete außerdem einen ziemlich hohen Antitrypsingehalt in der Spülflüssigkeit, welche die Gefäße einer isolierten Hundespeicheldrüse passierte. Alles dieses spricht gegen die Möglichkeit einer Identifizierung von Antitrypsin und Serumalbumin. Zweifellos besitzt das hochdisperse und stark hydratisierte Serumeiweiß die Fähigkeit einer antitryptischen Wirkung, sehr wahrscheinlich kann diese Wirkung auch beobachtet werden, das gibt uns aber noch kein Recht zu behaupten, daß das Serum keine anderen trypsinbindenden Stoffe enthält, und daß eine Veränderung im Gehalt eines solchen Stoffes die Schwankungen des antitryptischen Indexes in ziemlich weiten Grenzen, wie es bei einigen Erkrankungen beobachtet wird, bedingt.

In dieser Weise kommen wir von neuem zu der Überzeugung, daß unsere Kenntnis der Eigenschaften des Antitrypsins noch ungenügend ist, da nur auf dem Wege eines erschöpfenden Studiums dieses so interessanten Faktors (ich will ihn nicht mit dem Worte „Stoff“ bezeichnen, da vom Standpunkte der oben erwähnten physikalisch-chemischen Theorie aus, die auch von *Schierge* unterstützt wird, das Antitrypsin nur ein Zustand der Serumproteine ist) ein mehr oder weniger erschöpfender Begriff über seine Natur erhalten werden kann.

Um sich von der Mangelhaftigkeit unserer Kenntnisse über die Eigenschaften des Antitrypsins zu vergewissern, genügt ein Vergleich der von verschiedenen Forschern beim Studium irgend einer seiner Eigenschaften, z. B. der Thermolabilität (7) erhaltenen Resultate. Während einige Autoren verschiedene Temperaturintervalle, bei denen das Antitrypsin zerstört wird, angeben, und zwar von 56 bis 75°, behaupten wieder die anderen, daß Antitrypsin koktostabil sei, und in keinem einzelnen Falle finden wir den kleinsten Hinweis darauf, ob die Bedingungen, unter welchen das Verhalten des Antitrypsins gegenüber Temperatur studiert wurde, in Betracht kamen. Es wäre jedoch gewiß von großem Interesse, eine Vorstellung über die Einwirkungen verschiedener Faktoren, besonders der Milieureaktion, auf die Zerstörung des Antitrypsins durch Wärme zu gewinnen, dieses würde uns die Möglichkeit geben, einen näheren Begriff über seine Natur zu erhalten. In der Tat, sollte das Antitrypsin ein kolloidaler protein-

artiger Stoff sein, oder wäre es nur ein bestimmter physikalischer Zustand des Serumalbumins (hoher Dispersitäts- und Hydratationsgrad), ihm müßten schon deshalb die für Proteine charakteristischen Eigenschaften zugeschrieben werden, welche aus der Zugehörigkeit der Proteine zu den amphotären Elektrolyten hervorgehen. Als eine solche steht an erster Stelle der isoelektrische Punkt, d. h. die Konzentration der Wasserstoffionen, bei welcher ein Minimum von Dissoziation der Ampholytmoleküle und ein damit verbundenes Minimum von Stabilität vorliegt, was durch eine Tendenz der entstandenen Teilchen zur Bildung von größeren Aggregaten (im Falle eines kolloidalen Charakters des Ampholyten) erklärt werden kann. Die Mehrzahl der Proteine wird in diesen Bedingungen gefällt, und nur solche Proteine, deren Teilchen stark hydratisiert sind, wie z. B. Serumalbumin, bleiben in Lösung. Um sie ihrer Stabilität zu berauben, muß die Hydratation ihrer Teilchen vermindert werden, was auf verschiedenen Wegen, z. B. durch Erhitzen, erreicht werden kann.

Angenommen, daß die charakteristischste Eigenschaft des Antitrypsins — seine Fähigkeit, Trypsin zu binden — eine Folge seiner hohen Dispersität ist, andererseits, daß es als ein eiweißartiger Stoff angesehen wird, müssen wir daraus schließen, daß, wenn unsere Vermutungen richtig sind, das Antitrypsin bei bestimmter Wasserstoffionenkonzentration, welche dem vorausgesetzten isoelektrischen Punkt entsprechen muß, eine verminderte Stabilität verschiedenen Einwirkungen gegenüber, speziell dem Erhitzen, besitzen muß. Die Labilität des Antitrypsins beim Erhitzen muß sich in dem Verlust seiner die Trypsinverdauung hemmenden Fähigkeit äußern. In dieser Weise muß die Abhängigkeit der Antitrypsinzerstörung durch Wärme von der Wasserstoffionenkonzentration in einer gewöhnlichen Kurve des Dissoziationsrestes Ausdruck finden (8).

Das Ziel dieser Arbeit war eine experimentelle Prüfung obiger Voraussetzungen. Da es nicht meine Absicht war, die Temperaturgrenzen für die Widerstandsfähigkeit des Antitrypsins festzustellen, sondern nur ihre Abhängigkeit von der Reaktion des Milieus, so wählte ich nach einer Reihe von Versuchen eine bestimmte Temperatur und eine begrenzte Zeit ihrer Einwirkung, welche ich auch in allen späteren Versuchen einhielt. Die Temperatur war 65°, die Zeitdauer 40 Minuten.

Die Versuche wurden folgenderweise durchgeführt: Serum wurde mit Wasser 1 : 20 verdünnt. In eine Reihe von Reagenzgläsern wurden je 5 ccm Puffer, der aus einer Mischung von n/10 Lösungen von Essigsäure und essigsaurem Natrium zubereitet war, hinzugegeben, wonach in jedes Glas noch 5 ccm der genannten Serumlösung gegeben wurde; danach stellten wir alle Gläser gleichzeitig in ein bis 65° erwärmtes Wasserbad für 40 Minuten. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Reagenzgläser mit

kaltm Wasser gekühlt, aus jedem mit einer Pipette 5 ccm Flüssigkeit entnommen und in kleine Erlenmeyerkolben eingetragen. Die in den Reagenzgläsern übriggebliebene Flüssigkeit diente zum Bestimmen von p_H auf elektrometrischen Wege. Die Flüssigkeit in den Erlenmeyerkolben wurde vorsichtig mit einer $n/10$ NaOH-Lösung neutralisiert, wonach die Volumina mit Wasser ausgeglichen wurden; in jedes Kölbchen gelangten nun 2,5 ccm $m/3$ Phosphatlösung von $p_H = 7,5$ bis 7,7, um die Trypsinverdauung günstig zu gestalten. Weiter wurden in die Kolben je 1 ccm Trypsinlösung (*Kahlbaum*) 1 : 1000 in destilliertem Wasser und nach Verlauf von 15 Minuten 5 ccm 1%iger neutraler Caseinlösung hinzugegeben. Nach Zusatz einiger Tropfen Toluol wurden die Kolben gut verkorkt und in einen Thermostaten bei 37° für etwa 24 Stunden gestellt. Die Arbeit des Trypsins wurde durch den Rest-N-Zuwachs im Vergleich mit der Kontrolle bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde die Lösung mit kolloidalem Eisenoxyd enteiweißt und der Stickstoff im Filtrat nach *Kjeldahl* (Mikro) bestimmt.

Bildete sich während des Erwärmens des Serums mit der Acetatmischung in einigen Reagenzgläsern ein Niederschlag von Eiweiß (Globulin), so wurde die Flüssigkeit, ehe sie in die Erlenmeyerkolben gelangte, bis zu einer regelmäßigen Verteilung des Niederschlags sorgfältig umgerührt, wonach erst die Flüssigkeit mit einer Pipette abgemessen wurde. Bei nachfolgender Neutralisation und Zugabe des Phosphatgemisches quoll der Niederschlag ziemlich stark auf, löste sich jedoch nicht.

In den unten angeführten Tabellen wird das makroskopische Bild der Flüssigkeit nach dem Erwärmen angegeben.

Die ersten Versuche wurden mit Kaninchenseris angestellt, und zwar mit dreien. In den Tabellen wird nur der Rest-N-Zuwachs während des Aufenthaltes der Proben im Thermostaten angegeben, d. h. der Unterschied zwischen dem End- und Anfangsgehalt, welcher im Kontrollversuch bestimmt wurde.

Versuch 1.

Kaninchenserum 1. Versuchsdauer 22 Stunden.

	1	2	3	4	5	6	7
Erwärmen bei p_H . .	6,03 klar	5,39 starke Opaleszenz	4,79 kleine Flocken	4,47 Opaleszenz	3,95	3,55 klar	—
Rest-N-Zuwachs in mg	0,68	1,27	2,40	1,62	0,78	0,50	0,53

Versuch 2.

Kaninchenserum 1. Versuchsdauer 22 Stunden.

	1	2	3	4	5	6
Erwärmen bei p_H . .	5,71 schwache Opalesz.	5,41 starke Opalesz.	5,11 grobe Flocken	4,72 feine Flocken	4,47 Opalesz.	—
Rest-N-Zuwachs in mg	0,76	1,63	2,02	2,18	1,71	0,53

Die Resultate beider Versuche sind graphisch auf der Abb. 1 abgebildet. Zuallererst sehen wir aus diesen Versuchen, daß eine ganz bestimmte Abhängigkeit der Thermolabilität des Antitrypsins von der Reaktion des Milieus existiert, wobei bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration ein deutlich ausgeprägtes Maximum einer



Abb. 1.

Antitrypsinzerstörung durch Wärme vorliegt. Weiter sehen wir deutlich aus Versuch 1, daß Antitrypsin durch Säuren nicht zerstört wird, da bei einem allmählichen Ansteigen der Azidität die Zerstörungskurve des Antitrypsins fällt, ungeachtet dessen, daß in meinen Versuchen eine verhältnismäßig hohe Temperatur — 65° — angewandt wurde. Bei der höchsten von mir angewandten Azidität ($p_H = 3.55$) unter

vorliegenden Versuchsbedingungen wird überhaupt keine Antitrypsinzerstörung beobachtet (vgl. die Zahlen des Rest-N-Zuwachses der Vertikalreihen 6 und 7 im Versuch 1).

Sehr interessant scheint die nahe Übereinstimmung der für Antitrypsinzerstörung optimalen H^+ -Konzentration mit dem isoelektrischen Punkt der Serumproteine. Aus den Tabellen ist zu ersehen, daß Antitrypsin besonders stark zerstört wird, wenn eine teilweise Fällung der Proteine oder eine Opaleszenz eintritt; beide Erscheinungen hängen unmittelbar mit Verminderung des Dispersitätsgrades zusammen.

Die Serie zweier anderer Kaninchen, mit welchen die Versuche 3 und 4 angestellt wurden, zeigten analoge Resultate.

Versuch 3. Kaninchenserum 2. Versuchsdauer 22 Stunden.

	1	2	3	4	5	6	7
Erwärmen bei p_H . .	6,03	5,56 leichte Opalesz.	5,27 Trübung	4,98 Flocken	4,68 Trübung	4,41 schwache Opalesz.	4,10 klar
Rest-N-Zuwachs in mg	0,81	2,11	2,51	2,31	1,75	1,32	0,77

Versuch 4. Kaninchenserum 3. Versuchsdauer 23 Stunden.

	1	2	3	4	5	6	7
Erwärmen bei p_H . .	6,06 klar	5,55 starke Opalesz.	5,27 Flocken	4,95 Flocken	4,67 Flocken	4,38 leichte Opalesz.	4,12 klar
Rest-N-Zuwachs in mg	0,42	1,62	2,40	2,60	2,68	2,13	1,38

Außer dem Parallelismus zwischen der Antitrypsinzerstörung und der Bildung von größeren Komplexen aus den Eiweißpartikelchen, die aus einer Trübung und Flockenbildung bestehen, ist aus diesen Versuchen eine interessante Tatsache zu ersehen, daß ein Maximum von Antitrypsinzerstörung für verschiedene Sera nicht vollständig zusammentrifft. Da wir der Kontrolle des erwähnten Parallelismus unsere besondere Aufmerksamkeit schenken und die zu diesem Zweck angestellten Versuche weiter angeführt werden, wollen wir hier nur die Frage der verschiedenen Maxima berühren. Vergleichen wir die Resultate der drei Versuche mit Kaninchenserum, so sehen wir, daß die Verschiebung der Maxima keinen zufälligen Charakter trägt, daß bei einer Verschiebung des Maximums die ganze Kurve eine Tendenz zur Verschiebung nach derselben Richtung hinzeigt. Besonders deutlich sehen wir das beim Vergleich der Kurven der Antitrypsinzerstörung im Kaninchenserum mit einer gleichen Kurve, erhalten aus einem Hundeserumversuch (Versuch 5).

Es wäre voreilig, irgend einen bestimmten Schluß zu ziehen über die Abhängigkeit einer für Antitrypsinzerstörung optimalen Reaktion des Milieus von irgend einer Qualität des Serums.

Wenn ich diese Frage trotzdem berühre, so tue ich es nur deshalb, weil vom theoretischen Standpunkt aus die Existenz so einer Abhängigkeit nicht unmöglich wäre. Es ist hier von einer Abhängigkeit zwischen Antitrypsingehalt des Serums und einer für seine Zerstörung optimalen H^+ -Konzentration die Rede, und zwar äußert sich diese Abhängigkeit in der Weise, daß im Serum mit einem höheren Antitrypsingehalt das Maximum der Zerstörung desselben in einem saureren Milieu liegt, als das Maximum mit niedrigerem Antitrypsingehalt. Dementsprechend wurde in einem Hundeserum (Versuch 5) eine höhere optimale Konzentration der Wasserstoffionen gefunden als in einem Kaninchenserum, und gerade *Launoys* (9) Versuche zeigen, daß in der Tierreihe, aufgestellt nach dem Antitrypsingehalt, der Hund eine höhere Stufe einnimmt als das Kaninchen.

Versuch 5.

Hundeserum. Versuchsdauer 21 Stunden.

	1	2	3	4	5	6	7
Erwärmen bei p_H . .	5,35 Flocken	4,96 Flocken	4,69 Flocken u. starke Trübung	4,42 schwache Opalesz.	4,12 klar	3,85 klar	3,60 klar
Rest-N-Zuwachs in mg	0,97	2,31	2,60	2,59	2,08	1,90	1,46

In dieser Hinsicht wäre es interessant, diesen Versuch mit anderen zu vergleichen, wo statt des Serums eine Lösung von Blutalbumin,

das gewöhnlich aus Rinderserum zubereitet wird, verwendet wurde. Nach *Finzi* (10) nimmt das Rind, was den Antitrypsingehalt des Serums betrifft, eine der ersten Stellen ein. Es zeigte tatsächlich der Versuch 6, daß eine 0,2 %ige Albuminlösung (Albuminum e sanguine), was einem Serum in Verdünnung 1 : 40 entspricht, eine sehr starke antitryptische Wirkung erzeugt.

Versuch 6. 0,1 g fein verriebenes Albumin wird mit 50 ccm Wasser übergossen und in einen Thermostaten bei 37° gestellt. Nach einer halben Stunde wird die Lösung durch eine Schicht Theorit¹ filtriert. Das Filtrat zeigt eine schwache Opaleszenz. In zwei Kolben werden je 5 ccm Albuminlösung, je 2,5 ccm Phosphatpuffer, je 1 ccm Trypsinlösung und je 5 ccm 1 %ige Caseinlösung eingetragen. Ein Kölbchen dient als Kontrolle. Verdauungsdauer bei 37° 23 Stunden.

Kontrolle: 0,28 mg Rest-N; Versuch 0,38 mg Rest-N. Zuwachs des Rest-N = 0,10 mg.

Die Versuche mit Albuminlösung wurden genau ebenso wie die früher beschriebenen Versuche mit Serum angestellt. Die Albuminlösung wurde, wie in Versuch 6 beschrieben ist, zubereitet, ihre Konzentration aber war 0,4 %, was einer Serumverdünnung 1 : 20, wie sie bei den Serumversuchen angewandt wurde, entspricht.

Versuch 7.

Albuminlösung. Versuchsdauer 21 Stunden.

	1	2	3	4	5	6	7
Erwärmen bei p_H . .	5,55 Flocken trübe Lösung	5,27 Flocken Opalesz. Lösung	5,00 Flocken trübe Lösung	4,68 Opalesz.	4,41 schwache Opalesz.	4,11 klar	3,87 klar
Rest-N-Zuwachs in mg	1,18	1,66	2,32	2,60	2,74	2,70	2,56

Versuch 8.

Albuminlösung. Versuchsdauer 20 Stunden.

	1	2	3	4	5	6	7
Erwärmen bei p_H . .	5,31 Flocken Opalesz. Lösung	4,96 Flocken trübe Lösung	4,67 starke Opalesz.	4,41 leichte Opalesz.	4,12 klar	3,80 klar	3,55 klar
Rest-N-Zuwachs in mg	0,78	1,27	1,65	2,38	2,50	2,44	1,69

Wie ich auch erwartet hatte, zeigte die Albuminlösung ein Maximum von Antitrypsinzerstörung, welches in einem saureren Milieu lag, als das für Sera von Kaninchen und Hund gefundene. Der Umstand, daß

¹ Ein filtrierendes Material der Firma Seitz.

es beim Bereiten von Albuminlösungen schwer gelingt, zwei Lösungen zu erhalten, welche sich unter ganz gleichen Bedingungen dem Erwärmen gegenüber egal verhielten, läßt sich durch den kolloidalen Charakter des Antitrypsins erklären. So kommt es, daß in den Versuchen 7 und 8 die Zerstörungsmaxima wohl in einem saureren Milieu liegen, als in den früher beschriebenen Versuchen, jedoch nicht vollkommen zusammenfallen.

Schon der Versuch 5, besonders aber 7 und 8, zeigen uns, daß zwischen dem Entstehen von grob-dispersen Teilchen in den Eiweißlösungen und der Antitrypsinzerstörung kein Zusammenhang besteht. In der Tat wird in den Versuchen 7 und 8 eine maximale Antitrypsinzerstörung bei solchen Konzentrationen von Wasserstoffionen beobachtet, bei welcher die Flüssigkeit nach Erwärmen bis 65° im Laufe von 40 Minuten beinahe keine äußere Veränderung zeigt: sie bleibt klar oder opalesziert nur leicht. Spezielle Versuche 9, 10 und 11 überzeugen uns, daß sicher kein Zusammenhang zwischen der Bildung von Niederschlägen und der Zerstörung des Antitrypsins existiert. In diesen Versuchen wurde das Erwärmen der Serumlösungen bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration in Anwesenheit eines neutralen Salzes mit zweiwertigen Anionen vorgenommen.

Nach *Michaelis* u. a. (11) verschieben Salze das Flockungsoptimum von Proteinen; die Anionen — nach der Seite einer größeren, die Kationen — einer geringeren Azidität im Vergleich zum isoelektrischen Punkt des Proteins. Zu meinen Versuchen nahm ich schwefelsaures Natrium, dessen Konzentration in den Reagenzgläsern m/10 war. Das Sulfation muß das Flockungsoptimum nach der sauren Seite verschieben.

Versuch 9.

Kaninchenserum 2. Na_2SO_4 m/10. Versuchsdauer 22 Stunden.

	1	2	3	4	5	6
Erwärmen bei p_{H} . .	5,65 klar	4,84 leichte Opaleszenz	4,57 trüb	4,31 Flocken	4,03 Flocken	3,72 Flocken
Rest-N-Zuwachs in mg	0,68	1,91	1,52	0,69	0,55	0,46

Versuch 9 ebenso wie 10 zeigen ganz augenscheinlich, daß, wenn das Flockungsoptimum in Anwesenheit von Natriumsulfat sich scharf verschiebt und, im Vergleich mit den Versuchen ohne Salz, in ein saureres Milieu übergeht, die Lage des Maximums der Antitrypsinzerstörung durch Wärme unbeeinflusst bleibt (vgl. Versuch 3 mit demselben Serum).

Versuch 10.

Kaninchenserum 2. Na_2SO_4 m/10. Versuchsdauer 19 Stunden.

	1	2	3	4	5	6	7
Erwärmen bei p_H . .	5,93 klar	5,38 klar	5,10 sehr leichte Opalesz.	4,78 leichte Opalesz.	4,52 trüb	4,25 Flocken	3,98 Flocken
Rest-N-Zuwachs in mg	0,61	1,83	2,14	2,14	1,62	0,88	0,44

Ein gleiches Resultat zeigte Versuch 11, wo statt des Serums eine Albuminlösung angewandt wurde; letztere gab in Anwesenheit von Natriumsulfat eine Flockung längs der ganzen p_H -Reihe von 5,2 bis 3,5, trotzdem ging die Antitrypsinzerstörung in normaler Weise, und das Maximum blieb unverschoben.

Versuch 11.

Albuminlösung Na_2SO_4 m/10. Versuchsdauer 22 Stunden.

	1	2	3	4	5	6	7
Erwärmen bei p_H . .	5,21	4,89	4,56	4,32	3,99	3,72	3,50
	Flocken						
Rest-N-Zuwachs in mg	0,85	1,27	2,00	2,37	2,30	2,27	1,32

Da eine Bildung von Niederschlägen, die ich in meinen Versuchen beobachten konnte, auf Rechnung der Serumglobuline geschrieben werden kann, so können wir aus den angeführten Versuchen schließen, daß Globuline und Antitrypsin nichts Gemeinsames haben; wenn es trotzdem vorkommt, daß eine Globulinfraktion, gewonnen durch fraktioniertes Fällen des Serums, antitryptische Wirkung ausübt, wie es von *Kämmerer* u. a. (12) beobachtet wurde, so wohl nur deshalb, weil der Globulinniederschlag Stoffe verankert, welche die antitryptische Wirkung des Serums bedingen. Daß Antitrypsin durch Globulinniederschläge, welche sich beim Erwärmen des Serums und bei entsprechender Reaktion des Milieus bilden, verankert werden kann, zeigt Versuch 12.

Versuch 12.

Kaninchenserum 2. 20 ccm Serumlösung 1 : 20, Na_2SO_4 m/10 wurden mit 20 ccm Acetattuffer vermengt; die Bestimmung von p_H gab 3,54. Das Gemisch wurde in drei Reagenzgläser zu je 12 ccm verteilt. Ein Reagenzglas blieb bei Zimmertemperatur, die beiden anderen wurden, wie gewöhnlich, bei 65° 40 Minuten lang erwärmt; in beiden fiel ein Eiweißniederschlag aus. Die Flüssigkeit aus dem Reagenzglas 3 wurde nach Erkalten zentrifugiert; 5 ccm klaren Zentrifugats wurden entnommen und

in ein Erlenmeyerkölbchen eingetragen. Aus den Gläsern 1 und 2 wurden ebenfalls je 5 ccm genommen, die Flüssigkeit aber vorher bis zu einer gleichmäßigen Verteilung des Niederschlags umgerührt. Alle drei Proben wurden vorsichtig mit einer $n/10$ NaOH-Lösung neutralisiert; weiter wurde in derselben Weise verfahren, wie in den früheren Versuchen, d. h. Phosphatgemisch, Trypsin und Casein hinzugesetzt. Verdauungsdauer 21 Stunden. Die Bestimmung des Rest-N-Zuwachses gab folgende Zahlen: 1 0,37 mg, 2 0,35 mg, 3 0,60 mg.

Aus diesem Versuch geht hervor: Erstens, daß bei gegebener H⁺-Konzentration ($p_H = 3,54$) ein Erwärmen bis zu 65° im Laufe von 40 Minuten trotz der Ausfällung eines Eiweißniederschlags (vgl. Resultate 1 und 2) keine Antitrypsinzerstörung hervorruft, zweitens, daß der ausfallende Niederschlag teilweise das Antitrypsin mit sich reißt (vgl. 2 und 3). Die Stickstoffbestimmung im ganzen Gemisch und in dem Zentrifugat ergab in 5 ccm der Flüssigkeit: im Gemisch 1,55 mg, im Zentrifugat 0,61 mg. Es sind also beinahe 60 % Eiweiß in den Niederschlag übergegangen, und trotzdem wirkte das in keiner Weise auf den Antitrypsingehalt in der Lösung; der Niederschlag nahm eine verhältnismäßig geringe Menge Antitrypsin aus der Lösung mit. Jedenfalls ist eine Verminderung von antitryptischer Wirkung der Lösung als Resultat eines Ansichreißens des Antitrypsins durch das ausfallende Eiweiß viel geringer, als die von uns beobachtete und beschriebene, im Falle einer Zerstörung durch Wärme, bei entsprechenden Bedingungen.

Nachdem wir gezeigt hatten, daß der größte Teil des Antitrypsins durch Erwärmen zerstört werden kann, ohne irgend welche bemerkenswerte Veränderungen in dem physikalischen Zustande der Serumproteine hervorzurufen, andererseits, daß beinahe 60 % der Serum-eiweißstoffe entfernt werden können, ohne den antitryptischen Effekt zu beeinträchtigen, versuchten wir die Frage zu lösen, in welcher Weise sich die antitryptische Wirkung der Serumlösung verändern könnte, wenn die Entfernung von Proteinen die angegebene Grenze überschreitet.

Versuch 13.

Kaninchenserum 2, Na_2SO_4 m/10. Alle Konzentrationsverhältnisse dieselben wie früher; $p_H = 3,51$.

In die Reagenzgläser Nr. 2, 3 und 4 wurde 1 %ige Lösung von kolloidalem Eisenoxydhydrat zugesetzt, entsprechend 0,5, 1,0 und 2,0 ccm, und die Volumina mit Wasser ausgeglichen. Reagenzglas 5 enthielt Wasser statt Serumlösung. Nach Erwärmen bis zu 65° im Laufe von 40 Minuten wurden die Niederschläge zentrifugiert, die Zentrifugate zu je 5 ccm in Kolben verteilt und nach Neutralisation auf ihren Antitrypsingehalt wie in den früheren Versuchen geprüft. Verdauungsdauer 20 Stunden. Außerdem wurde in den Zentrifugaten der Stickstoff bestimmt. Die Anfangslösung enthielt 1,52 mg in 5 ccm.

	1	2	3	4	5
Fe(OH) ₃ in mg.	—	5,0	10,0	20,0	—
N in 5 ccm des Zentrifugats in mg	0,56	0,48	0,33	0,19	—
Rest-N-Zuwachs in mg	0,69	1,09	2,05	3,03	3,67

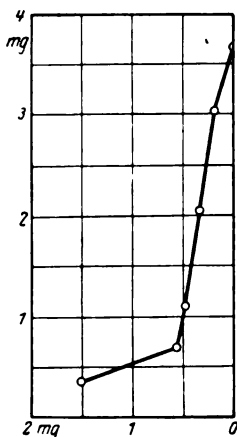


Abb. 2.

Wir sehen hier, wie auch in Versuch 12, daß 60 % Serumeiweiß ohne bedeutende Verminderung seiner antitryptischen Wirkung entfernt werden können. Überschreiten wir aber diese Grenze, so bemerken wir, daß der Anti-trypsingehalt scharf fällt, gleichzeitig sinkt der Stickstoff in der Lösung, was besonders deutlich aus einer graphischen Darstellung dieses Versuchs ersichtlich ist (Abb. 2). Auf dieser Zeichnung ist auf der Abszisse der N-Gehalt der Lösung, auf der Ordinate der Rest-N-Zuwachs, der durch 1 ccm Trypsin (1 : 1000) in Anwesenheit von 5 ccm der gegebenen Lösung hervorgerufen wird, aufgetragen; die Zahl des Rest-N-Zuwachses für die unveränderte Serumlösung wurde aus dem Versuch 12 entnommen.

Zum Schluß will ich noch einen Versuch anführen, in welchem wir die dehydratisierende Wirkung einer hohen Temperatur, verstärkt durch gleichzeitige Alkoholeinwirkung prüften.

Versuch 14.

Albuminlösung. Das Gemisch enthält 5 ccm 0,4 %ige Albuminlösung, 1 ccm n/10 Natriumacetatlösung und verschiedene Mengen von 96 %igem Äthylalkohol. Erwärmen bei 65° im Laufe von 40 Minuten. Nach dem Erwärmen wurden je 5 ccm Gemisch genommen, Alkohol hinzugesetzt, die Volumina mit Wasser ausgeglichen, Phosphatgemisch, Trypsin usw. hinzugesetzt. Verdauungsdauer 20 Stunden.

	1	2	3	4	5
Alkohol für 10 ccm Gemisch	0,0 klar	0,5 klar	1,0 klar	2,0 leichte Opaleszenz	4,0 Opaleszenz
Rest-N-Zuwachs in mg . .	0,64	1,02	1,57	1,69	1,82

Die Verstärkung der Trypsinwirkung in Anwesenheit einer mit Alkohol erwärmten Albuminlösung geht im Anfang ziemlich intensiv vor sich, bis zu etwa 10 %igem Alkoholgehalt. Weiterer Zusatz wirkt sehr wenig auf den antitryptischen Effekt der Lösung. Es muß bemerkt werden, daß, wenn der antitryptische Effekt mehr oder weniger sinkt,

das äußere Ansehen der Lösung ohne Veränderung bleibt, die Veränderungen aber als Opaleszenzerscheinungen bei solchen Alkoholkonzentrationen auftreten, welche nur eine unbedeutende weitere Verminderung der antitryptischen Wirkung hervorrufen.

Die erhaltenen Resultate zusammenfassend, können wir sagen, daß die Theorie der Eiweißnatur des Antitrypsins, um so mehr eine physikalisch-chemische Theorie, sich nicht bewährt. Zu einer endgültigen Entscheidung der Frage über die Natur des Antitrypsins besitzen wir aber noch zu wenig Material. Die Existenz einer Art isoelektrischen Punktes, was in einem deutlich ausgeprägten Maximum von Thermolabilität Ausdruck findet und uns die Möglichkeit gibt, das Antitrypsin zu der Klasse amphoterer Elektrolyten zu rechnen, gestattet uns, den Weg zur weiteren Arbeit auf diesem Gebiet zu suchen.

Als erste Etappe auf diesem Wege erscheint ein ausführliches Studium des Verhältnisses von Antitrypsin gegenüber Adsorbenten. Die Angaben, die wir in der Literatur besitzen, reichen noch lange nicht aus, um sich, wenn auch nur eine annähernde, Vorstellung über diese Seite der Frage zu machen. Eine Untersuchung in dieser Richtung ist im Gange.

Zusammenfassung.

1. Antitrypsin zeigt ein deutlich ausgeprägtes Zerstörungsmaximum durch Wärme bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration. Für Kaninchenserumlösungen wurde eine maximale Antitrypsinzerstörung bei 65°, Wirkungsdauer 40 Minuten, mit p_H 5,2 bis 4,7 festgestellt; für Hundeserum bei p_H 4,5 und für Blutalbuminlösung p_H 4,4 bis 4,1.

2. Das Optimum der Antitrypsinzerstörung verschiebt sich nicht in Anwesenheit eines Salzes mit einem zweiwertigen Anion (Na_2SO_4), während das Optimum der Eiweiß-(Globulin-)Koagulation von seiner normalen Lage, die mit dem isoelektrischen Punkt zusammenfällt, nach der Seite einer höheren Azidität verschoben wird. Der Unterschied zwischen diesen beiden Erscheinungen in ihrem Verhalten gegenüber Salzen beweist, daß eine einfache physikalische Zustandsänderung des Serumeiweißes nicht als Erklärung für die Antitrypsinzerstörung durch Wärme gelten kann. Trotzdem muß der Zerstörungsprozeß des Antitrypsins mit dem isoelektrischen Zustande des Proteins zusammenhängen, weil das Maximum der Antitrypsinzerstörung nahe bei dem isoelektrischen Punkte des Serumeiweißes liegt.

3. Mit der allmählichen Entfernung vom optimalen Punkte nach beiden Richtungen hin wird der Prozeß der Antitrypsinzerstörung immer weniger intensiv; er wird im Kaninchenserum bei p_H 3,5 beim

Erwärmen auf 65° im Verlauf von 40 Minuten überhaupt nicht beobachtet.

4. Der beim Erhitzen ausfallende Eiweißniederschlag (Globuline) nimmt einen Teil des Antitrypsins mit, aber nur eine geringe Menge; im übrigen ruft die Bildung des Eiweißniederschlags keine Veränderungen der antitryptischen Eigenschaften in den Serumlösungen hervor, und die Globulinfraction steht in keiner Beziehung zu dem Antitrypsin.

5. Die erhaltenen Resultate, welche auf einen amphotären Charakter des Antitrypsins schließen lassen, geben noch nicht die Möglichkeit einer Identifizierung desselben mit Serumalbumin. Deshalb bedarf die Proteintheorie des Antitrypsins einer weiteren experimentellen Kontrolle.

Literatur.

- 1) *Jobling und Petersen*, Zeitschr. f. Immun. **23**, 71, 1915. — 2) *Schierge*, Zeitschr. f. d. ges. Med. **32**, 142, 1923. — 3) *Hedin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **50**, 497, 1907; **57**, 468, 1908. — 4) *Michaelis und Davidoff*, diese Zeitschr. **46**, 131, 1912. — 5) *Stawraky*, Zeitschr. f. phys. Chem. **89**, 381, 1914. — 6) *Niskowsky*, diese Zeitschr. **179**, 62, 1926. — 7) *Oppenheimer*, Die Fermente usw., S. 1088. — 8) *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration. 1914. — 9) *Launoy*, Ann. Inst. Pasteur **33**, 1, 1919. — 10) *Finzi*, Arch. di Fisiol. **6**, 547, 1909. — 11) *Michaelis*, diese Zeitschr. **104**. — 12) *Kämmerer*, ebendasselbst **48**, 247, 1913.

Studien über intermediären Kohlehydratumsatz.

XXI. Mitteilung:

Über Glykose-, Milchsäure- und Phosphorsäurebildung in der Leberaufschwemmung unter dem Einflusse von Insulin.

Von

Theodor Brugsch und Hans Horsters.

(Aus dem Laboratorium der II. medizinischen Klinik der Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 11. Juli 1927.)

In unserer I. Mitteilung haben wir in Leberaufschwemmungsversuchen insulinisierter und nicht insulinisierter Tiere, mit und ohne Insulinzusatz einen Unterschied zwischen insulinisierter und nicht insulinisierter Leber gefunden¹.

Diese Versuche sind von *J. L. Chaikoff*² wiederholt worden mit dem Ergebnis, daß wesentliche Unterschiede nicht gefunden wurden. Wir haben nunmehr die Versuche unserer I. Mitteilung wieder aufgenommen unter möglichster Berücksichtigung der methodischen Fehlerquellen und unter Anwendung der für biologische Versuche einzig berechtigten statistischen Berechnungsmethode mit Zugrundelegung der quadratischen Abweichung.

Zur Methodik unserer Versuche sei bemerkt, daß die entblutete Leber durch Nackenschlag getöteter Tiere: Meerschweinchen, Kaninchen und Hunde durch den Latapie zerkleinert wurde und dann jedesmal gleiche Gewichtsteile Leberbrei mit Ringerlösung aufgeschwemmt wurden, die eine bestimmte Glykosekonzentration aufwies. Diese Aufschwemmung

¹ Theodor Brugsch, A. Benatt, Hans Horsters und R. Katz, diese Zeitschr. 147, 117, 1924.

² J. L. Chaikoff, mitgeteilt von J. J. R. Macleod, Mitt. a. d. Kgl. Gesellsch. von Canada 1926.

wurde in geschlossenen Gefäßen — mit oder ohne Insulinzusatz — bei 37° C im Brutschrank 1 Stunde und länger belassen, wobei Proben zur Glykose-, Milchsäure- und Phosphorsäurebestimmung vor und gleich nach Beendigung des Versuchs entnommen wurden. Die Versuche mit Durchlüftung der Leberbreisuspension wurden im Schüttelapparat bei 37° C und voluminöseren Gefäßen oder in *Deuvarschen* Flaschen vorgenommen. Die Enteiweißung geschah nach *Folin-Wu* bzw. durch Trichloressigsäure oder nach *Schenck* je nach den Erfordernissen der Analyse.

Als Reduktionsmethoden kamen in Anwendung: Methode von *Hartmann-Shaffer*¹, *Folin-Wu*², *Hagedorn-Jensen*³ und *Bertrand* in der Modifikation von *Moekkel* und *Frank*⁴, die von *Hagedorn-Jensen* wurde teilweise nach den Angaben von *Meyerhof-Lohmann*⁵ für Gewebssäfte ausgeführt.

Da für die Aufschwemmungsversuche Glykosekonzentrationen in Ringerlösung von 0 bis 0,5 % verwandt wurden, so gilt die Frage, wie groß ist die Sicherheit der Reduktionsmethoden bzw. wie groß ist der Fehler der genannten Methoden.

Dieser „Fehler“ der Methoden kann nach verschiedenen Gesichtspunkten gewertet werden: 1. als mittlerer Fehler, 2. als größte Abweichung, 3. als quadratische mittlere Abweichung; zu berücksichtigen ist hierbei zwar der optimale Geltungsbereich des Reduktionsverfahrens, d. h. die Breite der Zuckerkonzentration, innerhalb der das Verfahren brauchbare Werte liefert. Diese experimentell ermittelte Geltungsbreite wurde in allen Fällen innegehalten, so wurden z. B. bei dem auch von *Chaikoff* verwendeten *Hartmann-Shaffer*-Verfahren die Glucosewerte in den Analysen stets auf etwa 0,075 % durch entsprechende Verdünnung gebracht.

Über das *Shaffer-Hartmann*-Verfahren liegen in der Literatur mehrere Angaben vor; so ist der Fehler nach *Jonsell*, *Jorpes* und *Sickström*⁶ größer als der durchschnittliche Fehler der *Hagedorn-Jensen*-Methode, der 1,58 % beträgt, während *Hagedorn-Jensen* selbst 4 % angibt. Der Fehler wächst ferner bei der *Shaffer-Hartmannschen* Methode um so mehr, je kleiner die Gesamtkonzentration des Zuckers ist. Auch *Bugbee* und *Simmond*⁷ geben an, daß die *Shaffer-Hartmannsche* Methode bei 0,04 % Glucose (im Blute) ungenau wird. *Somogyi* weist nach, daß die Verminderung der Alkalinität zu höheren Reduktionswerten führt, da eine höhere Alkalikonzentration zu Zuckerspaltprodukten, die einer Oxydation zugänglicher

¹ Journ. of biol. Chem. 45, 349 und 365, 1921.

² Ebendaselbst 38, 51, 1919; 41, 367, 1920.

³ Diese Zeitschr. 135, 46, 1923; 137, 92, 1923.

⁴ *Bertrand*, Bull. soc. chim. 35, 1285, 1906; *Moekkel* und *Frank*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 84, 1910.

⁵ Diese Zeitschr. 176, 1926.

⁶ *Jonsell*, *Jorpes* und *Sickström*, Act. med. scand. 63, 446, 1926.

⁷ *Bugbee* und *Simmond*, Journ. labor. u. clin. med. 19, 990, 1925.

sind, führt. Die optimale Reaktion ist sowohl für die Cu- wie Fe-Reduktion ein $p_H = 9,4$ bis $9,5$; das gilt sowohl für *Shaffer-Hartmann* wie *Hagedorn-Jensen*. *Duggan* und *Scott*¹ finden für *Hagedorn-Jensen* eine Wirkungsbreite von 25 bis 200 mg-% und einen mittleren Fehler von 1,8%. Das Verfahren von *Shaffer-Hartmann* lieferte bei 20 mg-% Glykose keine Reduktion mehr.

Folin-Wu ergibt nach *Duggan* und *Scott* genaue Werte von 25 bis 200 mg-% mit der größten Abweichung von 1,8%. Erwähnenswert ist noch die Feststellung von *Holden*, daß die meisten Reduktionsmethoden der Zuckerbestimmung durch die Anwesenheit von Aminosäuren beeinflusst werden, außer der Methode von *Hagedorn-Jensen*.

Unter Innehaltung der in der Literatur niedergelegten Erfahrungen haben wir an einer großen Reihe von Versuchen den mittleren Fehler, die quadratische Abweichung und die größten Abweichungen für die folgenden Verfahren bestimmt.

Shaffer-Hartmannsche Methode (30 Versuche)

mittlerer Fehler: 0,42%, größte Abweichung + 3 bis — 4%;
quadratischer Abweichungsfehler (σ) = $\pm 0,72\%$.

Hagedorn-Jensensche Methode (15 Versuche)

mittlerer Fehler 1,2%, größte Abweichung + 5 bis — 4%;
quadratischer Abweichungsfehler (σ) = $\pm 1,0\%$.

Folin-Wusche Methode (18 Versuche)

mittlerer Fehler 1,8%, größte Abweichung + 3,5 bis — 3,0%;
quadratischer Abweichungsfehler (σ) = $\pm 0,77$.

Läßt man als die „normale“ Fehlerbreite innerhalb des Geltungsbereichs der Methoden den Wert von $M \pm 2\sigma$ gelten, so kommt man auf die Fehlerbreite von

2,88% bei *Shaffer-Hartmann*,
4 % „ *Hagedorn-Jensen*,
3,1 % „ *Folin-Wu*.

Man wird daher eine Fehlerbreite von 3 bis 4% den Reduktionsmethoden innerhalb des Geltungsbereichs der Methodik zugestehen müssen.

Wir geben nun aus 97 Versuchen einige hier wieder, um zu zeigen, in welcher Art die Durchführung der Experimente geschehen ist.

Das Resultat aller Versuche werden wir dabei nach statistischen Regeln verarbeiten.

Die in den folgenden Tabellen aufgeführten Werte bedeuten mg-% der Suspension. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens zwei Bestimmungen.

¹ *Duggan* und *Scott*, Journ. of biol. Chem. 67, 287, 1926.

Versuch 18.

9. November. 1926. Kaninchen: Gewicht 2300 g. Lebergewicht: 47 g.

48 Stunden Hunger. Die Leber wurde fein zerteilen und mit Warmblüter-Ringer mit und ohne Zusatz 1:10 aufgeschwemmt. Glykogeengehalt der Leber: 0,53 g-%.

Untersucht wurde: Glucose- und Phosphatstoffwechsel unter verschiedenen Bedingungen.

a) Ringer ohne Glucose und Kalium-Natrium-Phosphatgemisch. (Primäres Kaliumphosphat + sekundäres Natriumphosphat als Puffergemisch). (Siehe Sørensen, Erg. d. Physiolog. 12, 437).

b) Ringer mit 0,5% Glucose.

c) " ohne Glucose mit 3% Phosphat, p_H 7,0.

d) " mit 0,5% Glucose + 3% Phosphat, p_H 7,0.

Alle Versuche bei 37,5° ohne Zufuhr von atmosphärischem Sauerstoff.

	a) Ohne Glucose				b) Mit 0,5% Glucose			
	Polarimeter 2 dcm		Shaffer		Polarimeter 2 dcm		Shaffer	
	vor	90'	vor	90'	vor	90'	vor	90'
Ohne Insulin	± 0	+ 0,02°	21	40	+ 0,42°	+ 0,38°	464	480
Mit Insulin 50 E. (trocken) zu 100 cem	+ 0,02°	+ 0,03	26	42	0,43	0,41	452	490
					[α] _D ²⁰		{	
					0,395		464	
							452	

Reine Lösung ohne Leber, aber mit Glucose und Phosphat

	c) Ohne Glucose mit 3% Phosphat						d) Polarimeter 2 dcm				Shaffer		Bertrand		PO ₄ -Woy	
	Polarimeter 2 dcm		Shaffer		PO ₄ n. Woy**		vor		90'		vor		90'		vor	
	vor	90'	vor	90'	vor	90'	vor	90'	vor	90'	vor	90'	vor	90'	vor	90'
Ohne Insulin	+ 0,02°	+ 0,05°	21	21	1,6490*	—	+ 0,39°	+ 0,35°	452	480	460	508	1,7170	1,6968*		
Mit Insulin 50 E. (trocken) zu 100 cem	—	0,04	45	45	1,6694	1,6690	+ 0,44	+ 0,31	464	400	480	493	1,7108	1,6969		
Reine Lösung ohne Leber, aber mit Glucose und Phosphat							{		464		464		452		1,787 g	

* g./10. — ** Siehe Treatwell, Analyt. Chemie II.

Versuch 25. 26. Oktober 1926. Kaninchen, Gewicht 2650 g, Lebergewicht 70 g.

48 Stunden Hunger. Ringer mit 0,5% Glucose und wechselnder Konzentration von Natriumphosphat, pH etwa 7,4. Insulin 50 Einheiten auf 100 cem Saft. mg-%-Werte.

Phosphat- konzentration $p_H = 7,4$ o/o	Freie Lösung				Ohne Insulin				Mit Insulin			
	[α]D		Shaffer		[α]D		Shaffer		[α]D		Shaffer	
			vor	90'			vor	90'			vor	90'
		vor				vor				vor		
1	0,48 ⁰	466	0,47 ⁰	0,51 ⁰	483	507	0,49 ⁰	0,49 ⁰	485	512		
2	0,48	468	0,48	0,48	492	509	0,50	0,50	483	483		
3	0,49	485	0,48	0,51	479	448	0,50	0,50	485	465		
4	0,50	477	0,51	0,48	477	435	0,50	0,47	466	429		
5	0,51	468	0,50	0,46	466	448	0,51	0,45	477	429		

Versuch 24. 24. November 1926. Kaninchen, Gewicht 2700 g, Lebergewicht 73 g.

48 Stunden Hunger. Vor dem Versuch wurde Blut aus der Vena portae und der Vena hepatica entnommen zur Bestimmung des Blutphosphats.

Leber in Ringer mit 0,473% Glucose und 3% Kalium-Natriumphosphatpuffergemisch wechselnder pH . Insulin 50 Einheiten auf 100 cem Saft.

A. PO_4 -Gehalt der Vena portae 13,6 mg-%, PO_4 -Gehalt der Vena hepatica 13,14 mg-%.

B. Versuch am Leberbrei. 0,473% Glucose mit 3% Phosphat. mg-%-Werte.

Freie Lösung				Ohne Insulin						Mit Insulin					
pH	[α] _D	Glucose	PO ₄	Polarimeter		Shaffer		PO ₄ n. Briggs		Polarimeter		Shaffer		PO ₄ n. Briggs	
				vor	90'	vor	90'	vor	90'	vor	90'	vor	90'		
5,2	0,49 ⁰	465	1857	0,49 ⁰	0,48 ⁰	504	496	—	1962	0,51 ⁰	0,49 ⁰	515	496	1935	1920
6,3	0,50	473	1762	0,47	0,46	496	488	1842	1862	0,49	0,48	492	472	1831	1920
7,0	0,50	473	1650	0,49	0,48	501	478	1713	1621	0,50	0,45	486	467	1734	1667
8,0	0,48	456	1596	0,48	0,48	472	461	1732	1686	0,49	0,45	470	439	1713	1658

Versuch 19.

10. November 1926. Meerschweinchen.

24 Stunden Hunger. Ringer + 0,178 % Glucose + 1,40 % Kalium-Natriumphosphatpuffergemisch. $p_H = 7,0$.
Werte in mg-%.

	Ohne Glucose mit 1,40 % Phosphat							
	Polarimeter 2 dcm		Shaffer		Folin-Wu		PO ₄ Briggs	
	vor	90'	vor	90'	vor	90'	vor	90'
Ohne Insulin	+ 0,04°	± 0	36	48	+	++	830	780
Mit 50 E. Insulin (trocken, <i>Kahlbaum</i>) zu 100 cem	+ 0,02	+ 0,04°	26	36	+	++	810	790
Freie Lösung								

	Mit 0,178 % Glucose und 1,40 % Phosphat							
	Polarimeter 2 dcm		Shaffer		Folin-Wu		PO ₄ Briggs	
	vor	90'	vor	90'	vor	90'	vor	90'
Ohne Insulin	0,21°	0,065°	206	214	190	186	810	870
Mit 50 E. Insulin (trocken, <i>Kahlbaum</i>) zu 100 cem	0,20	0,045	201	200	180	188	840	790
Freie Lösung			178				812	

Versuch 30. 16. Dezember 1926. Pankreasloser Hund, Gewicht 6 kg, Lebergewicht 204 g.

Der Hund wurde am 10. Dezember 1926 operiert. Er erhielt 3 Tage lang nach der Operation pro die 20 Einheiten Insulin subkutan. Seit dem 12. Dezember frist der Hund nur sehr wenig. Am 13. Dezember werden z. B. Getränke erbrochen. Harnzucker +++.

Die Leber wurde mit Ringer 1 : 10 aufgeschwemmt, dazu die angegebenen Zusätze. Es wurde kein Phosphat vorgelegt. Werte in mg-%.

Art des Versuchs	Polarisation [α] _D				Glucose nach							
					Shaffer				Hagedorn-Jensen			
	vor	30'	60'	120'	vor	30'	60'	120'	vor	30'	60'	120'
A. Freie Lösung												
= Ringer + 0,3% Glucose	0,31 ⁰	—	—	—	274	—	—	—	262	—	—	—
B. Leberbrei.												
a) Anaerob	0,38	0,35 ⁰	0,33 ⁰	0,35 ⁰	344	324	315	310	334	352	320	370
b) Mit Luft bei 38° geschüttelt.												
I. Ringer ohne Glucose	0,12	0,10	0,10	0,07	—	123	123	121	—	124	128	134
II. Ringer + 0,3% Glucose	0,38	0,43	0,38	0,36	334	332	342	299	372	352	356	340
III. Ringer + 0,3% Glucose + 10 E.												
Insulin	0,40	0,41	0,36	0,36	341	350	319	334	320	366	344	348
IV. Ringer + 0,3% Glucose + 1 mg												
Thyroxin	0,42	0,38	0,37	0,38	334	355	312	334	332	344	360	380
Art des Versuchs	Milchsäure nach Clausen				PO ₄ nach Fiske und Subbarow				PO ₄ einschließlich* Hexosephosphat			
	vor	30'	60'	120'	vor	30'	60'	120'	vor	30'	60'	120'
A. Freie Lösung												
= Ringer + 0,3% Glucose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. Leberbrei.												
a) Anaerob	14,56	9,27	9,45	—	12,25	14,64	—	15,44	18,2	18,6	—	—
b) Mit Luft bei 38° geschüttelt.												
I. Ringer ohne Glucose	15,2	15,1	—	—	14,24	21,6	25,2	31,6	24,5	25,6	26,5	31,3
II. Ringer + 0,3% Glucose	13,5	9,1	9,32	—	13,98	23,8	25,8	30,4	22,8	27,0	27,1	29,8
III. Ringer + 0,3% Glucose + 10 E.												
Insulin	13,9	8,87	9,14	—	13,56	20,6	27,6	31,0	20,8	24,2	28,2	30,5
IV. Ringer + 0,3% Glucose + 1 mg												
Thyroxin	14,1	9,00	8,15	—	13,8	21,3	24,4	29,8	20,2	24,2	25,9	29,3

Art des Versuchs	Polarisation [α] _D			Glucose nach Hagedorn			Milchsäure			PO ₄ -Gehalt nach Fiske und Subbarow		
	vor	30'	60'	vor	30'	60'	vor	30'	60'	vor	30'	60'
A. Freie Ringerlösung	0,30 ⁰	0,31 ⁰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. Leberbrei.												
a) Anaerob + 0,3% Glucose	0,42	0,48	0,49 ⁰	444	456	528	—	—	—	10,0	17,12	26,5
b) Mit Luft geschüttelt.										9,96**	17,60	28,0
I. Ringer + 0,3% Glucose	0,45	0,46	0,48	444	456	488	8,1	9,9	10,3	9,42	24,20	35,6
II. Ringer + 0,3 % Glucose + 10 E. Insulin *	0,42	0,43	0,425	488	480	488	7,2	11,25	13,23	10,0	26,1	36,2
III. Ringer + 0,3 % Glucose + 1 mg Thyroxin	0,43	0,44	0,49	480	452	436	6,3	13,05	14,94	9,58	24,1	34,2
										9,41	26,8	35,66

* Die Zusätze sind auf 100 ccm Saft berechnet. — ** Beispiele für Mittelwerte aus vier Bestimmungen.

Versuch 32. 5. Januar 1927. Kaninchen, Gewicht 1900 g, Lebergewicht 45 g, 24 Stunden Hunger.
 Ringer + 0,3 % Glucose + 0,5 % Kaliumphosphatgemisch. $p_H = 7,4$. Die Leber schwimmt im Versuch Zucker aus.
 Werte in mg-%.

Art des Versuchs	Polarimetrie [α] _D			Milchsäure			PO ₄ -Gehalt		
	vor	30'	60'	vor	30'	60'	vor	30'	60'
A. Freie Lösung	+ 0,31 ⁰	—	—	—	—	—	258,0	—	—
B. Leberbrei.									
a) Anaerob	1,12	0,98 ⁰	0,90 ⁰	—	—	—	262,0	228,0	233,0
b) Mit Luft geschüttelt bei 38°.									
I. Ringer + 3 % Glucose	1,04	1,05	1,14	12,33	19,53	27,73	255,0	236,4	250,4
II. 0,3 % Glucose + 10 E. Insulin	1,18	0,99	1,10	12,78	19,16	26,28	254,6	244,6	253,6
III. 0,3 % Glucose + 1 mg Thyroxin	11,4	0,97	1,07	13,05	16,74	24,84	257,2	239,4	249,8

Versuch 33. Phlorrhizinversuch. 7. Januar 1927. Kaninchen, Gewicht 2100 g, Lebergewicht 62 g. 48 Stunden Hunger. Das Tier hat 0,5 g Phlorrhizin an 2 Tagen erhalten. Urin in Blase 28 ccm $[\alpha]_D = 1,20^\circ$. Ringer + 0,3% Glucose, kein Phosphat. Werte in mg-%.

	Polarimetrie $[\alpha]_D$			Glucose nach Shaffer			Milchsäure nach Clausen			PO ₄ nach Fiske-Subbarow			PO ₄ einschließlich Hexosephosphat		
	vor	30'	60'	vor	30'	60'	vor	30'	60'	vor	30'	60'	vor	30'	60'
A. Freie Lösung	0,28 ⁰	—	—	279	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. Leberbrei.	0,23	0,245 ⁰	0,22 ⁰	299	333	309	—	—	—	12,2	14,2	24,4	16,2	20,0	24,32
a) Anaerob	0,235	0,275	0,30	315	355	356	8,28	14,67	17,82	14,2	30,0	50,6	18,56	—	49,2
b) Bei 38° mit Luft geschüttelt.	0,225	0,28	0,305	301	344	310	8,37	12,15	17,19	13,28	28,64	49,2	18,16	29,76	47,0
I. Ohne Zusatz	0,235	0,245	0,32	314	332	332	8,73	13,68	13,70	13,22	29,8	52,24	18,2	36,2	52,0
II. Mit 10 E. Insulin															
III. Mit 1 mg Thyroxin . . .															

Versuch 34. Phlorrhizinversuch. 12. Januar 1927. Kaninchen, Gewicht 2700 g, Lebergewicht 70 g.

Hat 2 Tage je 0,5 g Phlorrhizin subkutan erhalten. Ringer mit 0,3% Glucose und 0,3% K-Phosphatgemisch. $p_H = 7,4$. Werte in mg-%.

	Polarimetrie $[\alpha]_D$			Glucose nach Shaffer			Milchsäure nach Clausen			PO ₄ nach Fiske-Subbarow					
	vor	30'	60'	vor	30'	60'	vor	30'	60'	säurelös. Phosphor			einschließlich Hexosephosphat		
A. Freie Lösung	0,345 ⁰	—	—	—	—	—	—	—	—	164,8	—	—	—	—	—
B. Leberbrei.	0,460	0,51 ⁰	0,51 ⁰	425	524	510	8,44	—	—	147,6	150,0	159,0	170,2	170,4	181,2
a) Anaerob	0,455	0,460	0,525	439	469	513	8,35	13,90	16,2	148,4	155,0	168,2	169,4	174,8	180,3
b) Bei 38° mit Luft geschüttelt.	0,470	0,480	0,530	439	439	488	8,23	12,70	15,04	149,2	151,6	162,4	170,2	—	180,9
I. Ohne Zusatz	0,455	0,485	0,535	417	470	503	8,45	12,60	16,31	149,0	153,8	168,0	169,2	173,6	182,0
II. Mit 50 E. Insulin															
III. Mit 3 mg Thyroxin . . .															

Versuch 35. 18. Jan. 1927. Hund, hat seit einigen Wochen Magenfistel. Beide N. vagi durchschnitten. Gew. 8 kg, Lebergew. 330 g. Kein Hunger. Ringer mit 0,3% Glucose und 0,3% Kaliumphosphatgemisch. $pH = 7,4$. Es fällt die große Diskrepanz zwischen Reduktionswert und Drehung auf. Werte in mg-%.

	Polarimetrie [α] _D			Glucose nach Shaffer			PO ₄					
	vor	30'	60'	vor	30'	60'	säurelöslicher Phosphor Fiske-Subbrow			einschließlich Hexosephosphat-Phosphor		
							vor	30'	60'	vor	30'	60'
A. Freie Lösung	0,315 ⁰	—	—	—	—	—	173,4 170,5	—	—	—	—	—
B. Leberbrei.	0,815	0,952 ⁰	1,040 ⁰	480	—	624	163,6	168,8	169,2	186,0	190,2	—
a) Anaerob	0,810	0,830	0,990	464	566	720	163,4	167,2	173,4	185,7	195,0	197,5
b) Bei 38° mit Luft geschüttelt.	0,798	0,924	1,010	465,8	631,7	656,0	163,4	164,8	175,6	182,5	190,2	200,8
I. Ohne Zusatz	0,802	0,954	1,046	—	709,1	759,7	163,0	168,4	173,4	185,2	193,0	202,0
II. Mit 50 E. Insulin . . .												
III. Mit 10 mg Thyroxin . .												

Versuch 36. 9. Februar 1927. Pankreasloser Hund, Versuch mit Phosphatzusatz. Gewicht 4000 g, Lebergewicht 115 g. Operiert am 20. Januar 1927. Partielle Exstirpation des Pankreas. Täglich 10 Einheiten Insulin. Die Leber hat ein gelbliches Aussehen, brüchig, starke Verfettung. Ringer mit 0,3% Glucose und 0,3% Kaliumphosphatgemisch. $pH = 7,4$. Werte in mg-%.

	Polarimetrie [α] _D			Glucose nach Shaffer			Milchsäure nach Clausen			PO ₄ säurelös. Phosphor		
	vor	30'	60'	vor	30'	60'	vor	30'	60'	vor	30'	60'
A. Freie Lösung	0,330 ⁰	—	—	327	—	—	—	—	—	178,6	—	—
B. Leberbrei.	0,335	0,315 ⁰	0,310 ⁰	364	350	342	6,75	6,98	—	164,6	183,4	167,0
a) Anaerob	0,325	0,340	0,305	356	360	342	6,53	10,23	23,63	163,8	167,2	169,0
b) Bei 38° mit Luft geschüttelt.	0,320	0,285	0,280	358	343	343	6,75	10,35	11,48	155,8	164,6	171,2
I. Ohne Zusatz	0,320	0,305	0,320	362	332	341	6,84	15,17	25,20	157,4	166,8	173,4
II. Mit 50 E. Insulin . . .												
III. Mit 10 mg Thyroxin . .												

Versuch 37.

18. Februar 1927. Kaninchen, Gewicht 1700 g, Lebergewicht 28 g.

48 Stunden Hunger. Ringer mit 0,3% Glucose und 0,3% Kaliumphosphatgemisch. $p_H = 7,4$. Werte in mg-%.

	Polarimetrie [α] _D		Glucose nach Shaffer		Milchsäure nach Clausen		PO ₄ säurelös. Phosphor nach Fiske u. Subbarow	
	vor	60'	vor	60'	vor	60'	vor	60'
A. Freie Lösung	0,308 ⁰	—	325	—	—	—	170,4	—
B. Leberbrei (mit Luft bei 38° geschüttelt).	0,295	0,270 ⁰	320	318	12,4	24,28	171,8	174,1
I. Ohne Zusatz	0,370	0,265	314	314	11,7	20,52	166,2	176,2
II. Mit 50 E. Insulin	0,285	0,290	305	318	12,26	23,04	167,8	175,6
III. Mit 10 mg Thyroxin								

Versuch 38.

4. März 1927. Hund, Gewicht etwa 15 kg. Glykogengehalt der Leber 0,7%.

Seit Anfang Januar 1927 komplette Gallenblasenfistel. Die Fistel ist seit 5 Wochen vernarbt. Gallenstauung, biliäre Cirrhose. Das Tier hat etwa 6 Liter Ascites im Bauchraum. Leber mit Ringer 1:10 mit 0,3% Glucose und 0,3% Kaliumphosphatgemisch. $p_H = 7,4$. Werte in mg-%.

	Polarimetrie [α] _D			Glucose nach Hagedorn-Naegelen*			Milchsäure nach Clausen			PO ₄ säurelös. Phosphor		
	vor	30'	60'	vor	30'	60'	vor	30'	60'	vor	30'	60'
A. Freie Lösung	0,285 ⁰	—	—	308	—	—	—	—	—	173,8	—	—
B. Leberbrei.	0,335	0,345 ⁰	0,400 ⁰	308	322	339	16,20	—	—	171,7	176,0	182,0
a) Anaerob										174,0		
b) Mit Luft bei 38° geschüttelt.												
I. Ohne Zusatz	0,330	0,350	0,400	308	324	351	15,48	30,24	48,6	176,0	185	183,0
II. Mit 100 E. Insulin	0,325	0,410	0,435	314	319	313	16,16	43,2	46,8	174,4	180,8	187,7
III. Mit 10 mg Thyroxin	0,325	0,400	0,440	314	310	334	18,0	25,2	39,6	174,4	182,6	187,8

* Neue Methode zur Glucosebestimmung in Organbreiten.

Zunächst stellen wir das Ergebnis der Zuckerausschwemmungswerte in der Lebersuspension für 60 Minuten Wertung in zwei Verteilungstabellen, geschieden nach dem Insulinzusatz, zusammen.

(Die Glykosezuwachswerte sind in Gruppen von je 5 mg $\left(\begin{smallmatrix} + 2,5 \text{ mg} \\ - 2,5 \text{ mg} \end{smallmatrix} \right)$ zusammengefaßt.)

- • Werte															+ • Werte														
70	65	60	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	
Ohne Insulinzusatz.																													
						1	4	2	2	3	6	4	6	9	14	5	10	9	8	3	4		2	2	3	2			
Mit Insulinzusatz.																													
2	1	1				2	1	1	5	4	2	2	3	9	5	10	3	1	2	1		2							

Man erkennt in der Verteilungstafel die Zunahme an negativen Werten unter dem Einfluß von Insulin; das spricht sich auch an den statistisch zu berechnenden Mittelwerten aus.

Mittelwert (berechnet nach den Originalwerten und nicht Gruppenwerten) der Reihe I (97 Versuche) = + 4,8 mg, $\sigma = \pm 17,6$ mg.

Mittelwert der Reihe II (berechnet nach den Originalwerten) der Reihe II (57 Versuche) = - 10,3 mg, $\sigma = \pm 13,6$ mg.

Es fragt sich nunmehr, sind diese Unterschiede zwischen insulinisierten und nicht insulinisierten Lebersuspensionen wesentliche, d. h. außerhalb der methodischen Zahlenbreite fallende, oder unwesentliche, d. h. in die methodisch bedingte Zahlenbreite fallende.

Um das zu beantworten, haben wir sämtliche Reduktionswerte der Versuche als prozentische Zu- oder Abnahme gegenüber den Ausgangswerten berechnet und diese Werte in einer Verteilungstafel zusammengestellt.

(Die prozentischen Abweichungen sind in Gruppen von 2% $\left(\begin{smallmatrix} + 1 \\ - 1 \end{smallmatrix} \right)$ zusammengefaßt.)

% der Reduktionszunahme																					
- • Reihe											+ • Reihe										
20	18	16	14	12	10	8	6	4	2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	
Ohne Insulin.																					
	1		3		2	3	7	4	11	17	12	11	8	5	3	1	1	1	3	2	
Mit Insulin.																					
1				1	6	3	1	9	3	10	3	4	4	2	1						

Es zeigt sich, daß von der ersten Reihe die Werte der Kolonne 0 und 2%, das sind $17 + 12 = 29$ von 97 Werten in die Fehlerbreite

der Methodik fallen, 68 Werte liegen außerhalb, von der Insulinreihe 13, und 35 Werte außerhalb.

Wir sind daher zu dem Schluß berechtigt, daß unter dem Einfluß von Insulin die Lebersuspension Zucker zum Verschwinden bringt. Die Versuche von Chaikoff sind damit in ihrem Ergebnis widerlegt.

Um weiter die näheren Bedingungen der Insulinwirkung auf den Reduktionswert festzustellen, lassen wir jetzt eine Zusammenstellung der Werte unter Berücksichtigung von Konzentration der Glykoselösung, Phosphatzusatz, p_H -Wert der Lösung und aeroben bzw. anaeroben Bedingung folgen.

Beziffern wir den Ablesungsfehler der Polarisation auf $\pm 0,02^\circ$, so entspricht diesem Fehler ein Glykosewert von $\pm 0,04\%$, d. h. ein Fehlerwert, wie er auch der Reduktionsmethode anhaftet.

Aus den Verteilungskurven ist ersichtlich, daß die Kolonnen $+ 0,02$ bis $- 0,02$ der Fehlergröße von $+ 0,02$ bzw. $- 0,02$ polarimetrisch entspreche. Hierher gehören von der ersten Verteilungskurve (ohne Insulin) 43 Werte, während 53 Werte außerhalb der Fehlerbreite liegen, bei der zweiten Verteilungskurve (mit Insulin) 45 Werte gegenüber 40 außerhalb der Fehlergrenze liegenden Werten.

Überblicken wir diese Tabelle, so finden wir eine Verminderung der Reduktion sowohl unter anaeroben wie aeroben Bedingungen. Ferner zeigt sich, daß bei allen gewählten Glykosekonzentrationen (zwischen 0,1 bis 0,5 %) eine Verminderung der Reduktion konstatiert werden kann, und daß Phosphatzusatz sowie Verschiebung des p_H nach der alkalischen Seite die Verminderung der Reduktion begünstigt.

Worauf beruht die Verminderung der Reduktion unter Insulinzusatz? Es wäre möglich, daß die Glykose durch die Leberelemente in Milchsäure gespalten wird und diese Spaltung das Reduktionsdefizit erklärt; weiter wäre denkbar, daß der Zucker oxydiert worden sei, was indessen von vornherein bei dem oft großen Reduktionsdefizit als ausgeschlossen gelten kann; schließlich ist die Frage zu diskutieren, ob nicht die Glykose in einen anderen Zucker übergeführt worden ist bzw. eine Bindung mit Phosphorsäure eingegangen ist. Diese Möglichkeiten lassen sich aus dem Ergebnis unserer Versuche zur Entscheidung bringen.

Zunächst zeigen die Versuche 30 bis 34 und 36 bis 38, daß Milchsäurebildung aus Glykose unter dem Einfluß von Insulin *nicht* das Reduktionsdefizit ersetzt.

Die Frage, ob unter dem Einfluß des Insulins die überlebende Leberzelle in der Suspension aus der Glykose einen anderen Zucker macht, läßt sich aus den Vergleichen von Reduktions- und Polarisationswerten insulinisierter und nicht insulinisierter Leber-Glykoseaufschwemmungen beantworten.

Ver- suchs- Nr.	Glykose- konzentration o/o	Phosphatzusatz o/o	p _H der Lösung	Aerob oder anaerob	Zunahme des Reduktionswertes gegenüber dem nicht insulinisierten Versuch o/o
11 *	0,25 0,25			aerob anaerob	+ 4 — 3
12	0,11			"	— 11
13	0,1 0,1			" "	— 5 — 13
16	0,18 0,18			" "	— 11 — 2
17	0,2 0,3 0,3			" " "	+ 6 — 4 + 5
18	0,5 0,5			" "	+ 8 + 5
19	0,178 0,178	1,40 1,40		" "	— 4 + 7
21	0,5 0,5 0,5 0,5 0,5	1 2 3 4 5		" " " " "	+ 10 + 7 — 8 — 5 — 8
22 *	0,48 0,48 0,48 0,48	3 3 3 3	5,2 6,3 7,0 8,0	" " " "	+ 2 + 1 — 4 — 9
23 *	0,48 0,48 0,48 0,48	1 2 3 4	7,4 7,4 7,4 7,4	" " " "	+ 7 + 0 — 3 — 2
24	0,473 0,473 0,473 0,473	3 3 3 3	5,2 6,3 7,0 8,0	" " " "	— 2 — 2 ± 0 — 4
25	0,5 0,5 0,5 0,5 0,5	1 2 3 4 5	7,4 7,4 7,4 7,4 7,4	" " " " "	± 0 — 3 — 1 ± 0 — 5
26	0,5 0,5	ohne Phosphat 3	— 7,0	" "	— 3 — 12
27	0,5	0,3	7,4	aerob	± 0
28	0,5	3	8,0	"	— 4
31	0,3	ohne Phosphat	—	"	± 0
33	0,3	" "	—	"	— 10
34	0,3	0,3	7,4	"	— 8
37	0,3	0,3	7,4	"	± 0

* Diese Versuche sind aus Gründen der Raumersparnis nur im Auszuge tabellarisch aufgeführt.

Verteilungskurve der Abweichungen des Reduktionswertes gegenüber dem Polarisationswert, berechnet auf Glykose.

Ohne Insulin.
g Glucose.

+ 0,12	+ 0,11	+ 0,10	+ 0,09	+ 0,08	+ 0,07	+ 0,06	+ 0,05	+ 0,04	+ 0,03	+ 0,02	+ 0,01
1		3	1	2	3	2	13	12	9	13	10
0,00	- 0,01	- 0,02	- 0,03	- 0,04	- 0,05	- 0,06	- 0,07	- 0,08	- 0,09	- 0,10	
13	4	3	1	3			1				

Mit Insulin.
g Glucose.

+ 0,12	+ 0,11	+ 0,10	+ 0,09	+ 0,08	+ 0,07	+ 0,06	+ 0,05	+ 0,04	+ 0,03	+ 0,02	+ 0,01
	1		3	4	6	2	2	5	9	5	13
0,00	- 0,01	- 0,02	- 0,03	- 0,04	- 0,05	- 0,06	- 0,07	- 0,08	- 0,09	- 0,10	
13	8	6	3	3	1	1					

Die Fehlerbreite der Ablesung der Polarisationswerte beträgt $\pm 0,02^0$, d. h. etwa 0,04 % Glucose. Danach fielen, in Anbetracht der Tatsache, daß der Mittelwert der Reihe I (ohne Insulin) = + 0,026, und der Insulinreihe = + 0,018 (+ 0,02) ist, die Werte + 0,04 bis + 0,01 der ersten Reihe, das sind 43, und die Werte + 0,03 bis 0,00 der zweiten Reihe, das sind 40, in die Grenzen der Zahlenbreite der Ablesung; das ist aber rund die Hälfte aller Werte der Reihen. Da zudem die Mittelwerte beider Reihen sich kaum unterscheiden (+ 0,03 bzw. 0,02), so ist nur der Schluß berechtigt, daß nach dem Verhalten beider Reihen sich hinsichtlich der Änderung des Polarisationswertes kein Unterschied durch die Insulinisierung der Suspension feststellen läßt.

Geht die Änderung der Reduktionswerte durch Insulinisierung parallel mit einer Änderung der Phosphatwerte, so daß aus dieser auf eine Zuckerphosphatverbindung unter dem Einfluß des Insulins in der überlebenden Leberzellenemulsion geschlossen werden darf?

Es wurde zu diesem Zweck die anorganische, d. h. freie bzw. säurelösliche Phosphorsäure in der Suspension vor und nach Beendigung des Versuches festgestellt.

Als Methode zur Bestimmung wurde verwandt die Methoden nach Embden, Neumann-Woy und Briggs-Bell-Doisy, Fiske und Subbarow. Die Fehlerbreite der Methoden darf mit 2 bis 4 % angesetzt werden. Im einzelnen können als Fehler der Methoden innerhalb des Bestimmungsintervalls gelten:

für Embden 1,5%¹; Neumann-Woy 2%²; Briggs, Bell und Doisy etwa 4% und darüber³ und Fiske und Subbarow 2 bis 3%⁴.

Aus den Versuchen 1 bis 12 ergibt sich, daß ohne Phosphatzusatz zur Lebersuspension sich *innerhalb einer Stunde* im Mittel 2,5 mg PO_4 als anorganisches PO_4 aus der Leber abspaltet (höchster Wert + 8,7, niedrigster Wert - 4,4 bei 9 negativen PO_4 -Werten gegenüber 31 positiven PO_4 -Werten).

Setzt man Phosphat zur Lebersuspension zu, so ändern sich die Durchschnittswerte bei höheren Phosphatkonzentrationen: Der Mittelwert wird negativ und beträgt - 30 mg PO_4 ; bei 0,3 % Phosphatkonzentration wird der Phosphatausschüttungswert wieder positiv, er beträgt + 4,1 mg PO_4 (im Mittel).

Vergleicht man hierzu die Phosphatausschüttung unter *Insulin*, so ergibt sich für die Phosphatausschwemmung in diesen Versuchen keine Abweichung vom Mittelwert, auch nicht für die hohen Phosphatkonzentrationen; für die niederen Phosphatkonzentrationen ist eher eine Zunahme des Phosphats festzustellen.

Zusammenfassend darf man daher sagen, daß in der überlebenden Leber-Ringerlösungssuspension unter dem Einfluß von Insulin durchschnittlich eine Abnahme der Reduktionswerte erfolgt, die nicht auf vermehrte Oxydation, Milchsäurebildung oder Phosphatveresterung oder Mutierung des Zuckers beruht, sondern auf eine Intussuszeption in den Leberbrei zurückgeführt werden muß.

¹ Abderhalden, Biochem. Arbeitsmethod. 4, 9, 551; Zeitschr. f. physiol. Chem. 113, 138ff., 1921.

² Treadwell, Analyt. Chem. II.

³ Hawk und Bergeim, Pract. biol. Chemistr. London 1927.

⁴ Dieselben, ebendasselbst. London 1927.

Studien über intermediären Kohlehydratumsatz.

(Brugsch und Horsters.)

XXII. Mitteilung:

Versuche über Bildung von Milchsäure in der Leber aus Äpfelsäure, Fumarsäure, Maleinsäure.

Von

Tsukio Ibuki.

(Aus dem Laboratorium der II. medizinischen Klinik der Charité Berlin.)

(Eingegangen am 11. Juli 1927.)

In der XIII. Mitteilung hat *Narita* in Leberdurchblutungsversuchen (der Hundeleber) gezeigt, daß die Essigsäure in der Leber weder unter normalen Verhältnissen, noch beim Pankreasdiabetes ein Milchsäurebildner ist, daß dagegen die Malonsäure, l-Weinsäure und Bernsteinsäure in der Leber des normalen Hundes wie des pankreasdiabetischen Hundes Milchsäurebildner sind. Wir haben nun auf Veranlassung von Prof. *Brugsch* die Frage des Überganges der Fumarsäure, der Äpfelsäure und Maleinsäure in Milchsäure untersucht, wobei wir in der Methodik uns an die in der XIII. Mitteilung gegebene Durchströmungsmethodik hielten.

Die Leber eines frisch entbluteten Hundes wird mit Ringer-Warmblüterlösung durchströmt; die Durchströmungsflüssigkeit enthält 0,1% Glykose. Temperaturmilieu 40°. Der Durchströmungsdruck wird so reguliert, daß 1 Liter jeweils verwendeter Durchströmungsflüssigkeit in etwa 20 Min. durch die Leber fließt. Zunächst wird dreimal die Leber durchströmt, wobei nach jedesmaligem Durchströmen in einer kleinen entnommenen Portion eine Zuckerbestimmung nach *Folin-Wu* und eine Milchsäurebestimmung nach *Clausen-Meyerhof* vorgenommen wird. Auf diese Weise kann die in der Zeiteinheit von der Leber abgegebene Menge Milchsäure bestimmt werden. Nach der dritten Durchströmung wird die Ringerlösung durch eine neue Ringerlösung ersetzt, die neben 0,1% Glykose den entsprechenden Körper in 0,1%iger Lösung als Na-Salz enthält. Die Durchströmung geschieht in analoger Weise wieder dreimal, und es werden entsprechende Bestimmungen der Milchsäure und der Glykose vorgenommen.

Bei der Bestimmung der Milchsäure nach *Clausen-Meyerhof*, bei dem die Milchsäure durch Oxydation zu Aldehyd bestimmt wird, zeigte es sich, daß auch Äpfelsäure, Fumarsäure und Maleinsäure Aldehyd nach Oxydation durch KMnO_4 liefern, wie folgende Versuche zeigen. Unter Verwendung

einer n/1000 KMnO_4 -Lösung, einer etwa n/50 Bisulfitlösung und einer n/100 Jodlösung ergaben:

10 ccm 0,1%iges Zinklactat (= 0,074% Milchsäure) nach Oxydation durch KMnO_4 und Destillation einen Jodverbrauch von 15,68 ccm n/100 Jodlösung, umgerechnet auf Milchsäure = 0,071%.

10 ccm 0,1%ige Äpfelsäure nach Oxydation durch KMnO_4 und Destillation einen Jodverbrauch von 10,30 ccm n/10 Jodlösung,

10 ccm 0,1%iges fumarsaures Na nach Oxydation durch KMnO_4 und Destillation einen Jodverbrauch von 3,1 ccm n/10 Jodlösung, und

10 ccm 0,1%iges maleinsaures Na nach Oxydation durch KMnO_4 und Destillation einen Jodverbrauch von 1,5 ccm n/10 Jodlösung.

Um also die Milchsäurewerte nach der Durchströmung der Leber mit Äpfelsäure, Fumarsäure und Maleinsäure einwandfrei zu erhalten, mußten die zugesetzten Körper aus der Durchströmungsflüssigkeit entfernt werden. Zu diesem Zwecke kann man sich des Verfahrens von *Steiner* und *Heide* bedienen, da die Kupferkalkfällung, wie uns Versuche lehrten, nicht imstande ist, Äpfelsäure, Fumarsäure und Maleinsäure quantitativ auszufällen. Das Verfahren von *Steiner* und *Heide* basiert auf der Ausfällung dieser Säuren durch Barium unter Lösung der Milchsäure in Alkohol. Im wesentlichen wurde folgende Methode durchgeführt:

Es werden 200 ccm der Durchströmungsflüssigkeit nach *Schenckscher* Enteiweißung und Entquecksilberung im Vakuum abgedampft, wobei fast die gesamte HCl vertrieben wird. Der Rückstand wird mit wenig Wasser aufgenommen und mit Natronlauge zu schwach saurer Reaktion abgestumpft. Dann wird die Lösung mit 2 ccm 10%iger BaCl_2 -Lösung versetzt und so viel feingepulvertes $\text{Ba}(\text{OH})_2$ unter Verwendung eines Tropfens Phenolphthalein als Indikator bis zur alkalischen Reaktion hinzugesetzt. Die Flüssigkeit wird auf 20 ccm gebracht und kalt unter Umrühren mit 85 ccm absoluten Alkohols versetzt. Nach mindestens zweistündigem Stehen wird der Niederschlag abfiltriert und sorgfältig mit 80%igem Alkohol ausgewaschen. Filtrat und Niederschlag werden getrennt verarbeitet, indem beide im Vakuum von Alkohol bis zur Trockne befreit und danach mit Wasser aufgenommen werden. Die weitere Prozedur vollzieht sich nach dem *Clausen-Meyerhofschen* Verfahren.

Beispiele:

- A. Obengenannte 10 ccm 0,1%ige Milchsäure in 200 ccm Flüssigkeit werden nach dem Verfahren vorbehandelt; der Bariumniederschlag und das alkoholische Filtrat werden getrennt nach dem *Clausen-Meyerhofschen* Verfahren auf Milchsäure bestimmt.

Es werden verbraucht für den Niederschlag 1,35 ccm n/100 Jod
 " " " " das Filtrat 16,75 " n/100 "

- B. 10 ccm 0,1%ige Äpfelsäure in 200 ccm Flüssigkeit; genau wie bei A verfahren.

Es werden verbraucht für den Niederschlag 6,25 ccm n/100 Jod
 " " " " das Filtrat 1,80 " n/100 "

- C. 10 ccm 0,1%iges fumarsaures Na in 200 ccm Flüssigkeit; genau wie bei A verfahren.

Es werden verbraucht für den Niederschlag 2,00 ccm n/100 Jod
 " " " " das Filtrat 0,40 " n/100 "

D. 10 ccm 0,1%iges maleinsaures Na in 200 ccm Flüssigkeit; genau wie bei A verfahren.

Es werden verbraucht für den Niederschlag 1,50 ccm n/100 Jod
 „ „ „ „ das Filtrat 0,20 „ n/100 „

Aus diesem Beispiel ist ersichtlich, daß zwar durch die Bariumfällung auch Milchsäure niedergedrungen wird, ein Verlust, der sich auf etwa 10% in unserer Versuchsanordnung berechnen läßt, und daß in das alkoholische Filtrat geringe Mengen der Äpfelsäure, Fumarsäure und Maleinsäure hineingehen; diese Werte können jedoch vernachlässigt werden.

I. Versuche mit Äpfelsäure (inaktiv).

Versuch A (normale Hundeleber).

Durchströmung mit Warmblüterringerlösung, die 0,1% Glykose enthält; im Hauptversuch ist 0,1%ige Äpfelsäure (neutralisiert) hinzugesetzt.

Zahl der Durchströmungen	Zeit der Durchströmungen Min.	Glykose mg-%	Milchsäure mg-%
Vorversuch.			
1	20	55	19
2	20	73	20
3	20	66	28
Hauptversuch (mit Äpfelsäure).			
1	20	68	37
2	20	64	36
3	20	63	32

Resultat: Die Vermehrung um durchschnittlich 13 mg-% des Milchsäurewertes gegenüber dem Vorversuch erscheint zu gering, um mit Sicherheit den Schluß auf den Übergang von Äpfelsäure in Milchsäure ziehen zu können.

Versuch B (normale Hundeleber).

Durchströmung mit Warmblüterringerlösung, die 0,1% Glykose enthält; im Hauptversuch ist 0,1%ige Äpfelsäure (neutralisiert) zugesetzt.

Zahl der Durchströmungen	Zeit der Durchströmungen Min.	Glykose mg-%	Milchsäure mg-%
Vorversuch.			
1	20	21	7
2	20	25	7
3	20	29	7
Hauptversuch (mit Äpfelsäure).			
1	20	25	27
2	20	24	29
3	20	23	28

Resultat: Im Hauptversuch ist eine Vermehrung des Milchsäurewertes um 20 mg-% eingetreten. Diese Vermehrung ist wohl ohne Zweifel auf die Äpfelsäure zurückzuführen.

Versuch C (normale Hundeleber).

Durchströmung mit Warmblüterringerlösung, die 0,1% Glucose enthält;
im Hauptversuch ist 0,1%ige Äpfelsäure (neutralisiert) zugesetzt.

Zahl der Durchströmungen	Zeit der Durchströmungen Min.	Glykose mg.‰	Milchsäure mg.‰
Vorversuch.			
1	20	73	43
2	20	135	31
3	20	98	43
Hauptversuch (mit Äpfelsäure).			
1	20	59	32
2	20	73	36
3	20	95	52

Die durchschnittliche Milchsäuremenge im Hauptversuch beträgt 40 mg, im Vorversuch 39 mg. Berücksichtigt man indessen die zunehmende Tendenz der Milchsäurewerte im Hauptversuch, so ist die Zunahme des Milchsäurewertes um 20 mg nach der dritten Durchströmung wahrscheinlich auf die Äpfelsäure zurückzuführen.

Versuch D (normale Hundeleber).

Durchströmung mit Warmblüterringerlösung, die 0,1% Glucose enthält;
im Hauptversuch ist 0,1%ige Äpfelsäure (neutralisiert) zugesetzt.

Zahl der Durchströmungen	Zeit der Durchströmungen Min.	Glykose mg.‰	Milchsäure mg.‰
Vorversuch.			
1	20	45	9
2	20	53	11
3	20	36	16
Hauptversuch.			
1	20	28	24
2	20	27	28
3	20	27	30

Die durchschnittliche Vermehrung der Milchsäure im Hauptversuch beträgt 18 mg; diese Vermehrung ist wohl zweifelsfrei auf die Äpfelsäure zurückzuführen.

Versuch E (normale Hundeleber).

Durchströmung mit Warmblüterringerlösung, die 0,1% Glucose enthält;
im Hauptversuch ist 0,1%ige Äpfelsäure (neutralisiert) hinzugesetzt.

Zahl der Durchströmungen	Zeit der Durchströmungen Min.	Glykose mg.‰	Milchsäure mg.‰
Vorversuch.			
1	20	113	35
2	20	109	34
3	20	120	42

Versuch E (Fortsetzung).

Zahl der Durchströmungen	Zeit der Durchströmungen Min.	Glykose mg. ⁰ / ₁₀	Milchsäure mg. ⁰ / ₁₀
Hauptversuch.			
1	20	82	44
2	20	103	48
3	20	123	44

Die durchschnittliche Vermehrung des Milchsäurewertes im Hauptversuch beträgt 8 mg. Der Wert erscheint zu niedrig, um mit Sicherheit auf die Milchsäure bezogen zu werden.

Fassen wir das Ergebnis dieser Versuche zusammen, so ergibt sich eine Vermehrung des Milchsäurewertes im Hauptversuch nach Durchströmung mit Äpfelsäure in

Versuch A von 13 mg,

„ B „ 20 „

„ C „ 1 (ev. bis 20 mg)

„ D „ 18 mg

„ E „ 8 „

In diesen Versuchen ist aber die Bestimmung der Milchsäure ohne vorherige Ausfällung der Äpfelsäure durchgeführt worden; wir haben deshalb zur Entscheidung der Frage, ob es sich um eine scheinbare oder wirkliche Vermehrung von Milchsäure nach Durchströmung mit Äpfelsäure handelt, die Ausfällung der Äpfelsäure mit Baryt (s. oben) vor der Milchsäureoxydation durchgeführt mit folgendem Ergebnis:

Versuch F (normale Hundeleber).

Zahl der Durchströmungen	Zeit der Durchströmungen Min.	Glykose mg. ⁰ / ₁₀	Scheinbare Milchsäure mg. ⁰ / ₁₀	Wirkliche Milchsäure in Baryt-filtrat mg. ⁰ / ₁₀	Baryt-niederschlag als Milchsäure berechnet mg. ⁰ / ₁₀
Vorversuch.					
1	20	43	21		
2	20	95	27		
3	20	63	37	24 mg	5 mg
Hauptversuch.					
1	20	30	31		
2	20	60	36		
3	20	56	42	20,3	20 mg

Der (scheinbare) Milchsäurewert ist nach Durchströmung mit Äpfelsäure um durchschnittlich 8 mg größer als im Vorversuch. Der wirkliche Milchsäurewert ist aber, wie die Untersuchungen an der dritten Durchströmung des Vorversuchs und Hauptversuchs zeigen, im Hauptversuch kleiner als im Vorversuch.

Das gleiche Ergebnis ergibt der nächste Versuch.

Versuch G (normale Hundeleber).

Zahl der Durchströmungen	Zeit der Durchströmungen Min.	Glykose mg. ^o / ₁₀	Scheinbare Milchsäure mg. ^o / ₁₀	Wirkliche Milchsäure in Baryt- filtrat mg. ^o / ₁₀	Baryt- niederschlag als Milchsäure berechnet mg. ^o / ₁₀
Vorversuch.					
1	20	60	39		
2	20	78	32		
3	20	91	36	32	2
Hauptversuch.					
1	20	38	24		
2	20	58	37		
3	20	62	37	18	14

Ist in diesem Versuche der durchschnittliche (scheinbare) Milchsäurewert im Hauptversuch kleiner als der durchschnittliche Milchsäurewert im Vorversuch, so zeigt die Barytfällung, daß der wirkliche Milchsäurewert im Hauptversuch weit kleiner als im Vorversuch ist, und daß der scheinbare Milchsäurewert der Äpfelsäure seine Erhöhung verdankt. Wenden wir die Erfahrungen dieser beiden Versuche auf die Ausdeutung der Versuche A bis E an, so darf man schließen, daß die Vermehrungen des Milchsäurewertes nach Durchströmung mit Äpfelsäure nur scheinbare sind, weil die Äpfelsäure nach dem *Clausen-Meyerhof'schen* Verfahren bei der Oxydation Acetaldehyd bildet, wodurch es zu einer fehlerhaften Vergrößerung des Milchsäurewertes kommt.

Ein Übergang von Äpfelsäure in Milchsäure bei der Leberdurchblutung ist nicht nachzuweisen.

Wir haben nun gleiche Versuche mit der Durchströmung von *Fumarsäure* durchgeführt.

II. Versuche mit Fumarsäure.

Versuch H (normale Hundeleber).

Durchströmung mit Warmblüterringerlösung, die 0,1% Glucose enthält; im Hauptversuch ist der Ringerlösung 0,138%iges fumarsaures Na (= 0,1% Fumarsäure) hinzugesetzt.

Zahl der Durchströmungen	Zeit der Durchströmungen Min.	Glykose mg. ^o / ₁₀	Milchsäure mg. ^o / ₁₀
Vorversuch.			
1	20	82	17
2	20	89	18
3	20	88	22
Hauptversuch.			
1	20	40	16
2	20	60	
3	20	94	22

Es läßt sich im Hauptversuch *keine* Vermehrung des Milchsäurewertes feststellen; das gleiche Ergebnis hat der Versuch J.

Versuch J (normale Hundeleber).

Durchströmung mit Warmblüterringerlösung, die 0,1% Glucose enthält; im Hauptversuch ist der Ringerlösung 0,138%iges fumarsaures Na (= 0,1% Fumarsäure) hinzugesetzt.

Zahl der Durchströmungen	Zeit der Durchströmungen Min.	Glykose mg.°/o	Scheinbare Milchsäure mg.°/o	Wirkliche Milchsäure in Baryt-filtrat mg.°/o	Baryt-niederschlag als Milchsäure berechnet mg.°/o
Vorversuch.					
1	20	45	15		
2	20	53	15		
3	20	54	18	11 mg	5 mg
Hauptversuch.					
1	20	23	16		
2	20	19	20		
3	20	19	22	6 mg	12 mg

In der Mitteilung von *Narita* (l. c.) wurden Durchblutungsversuche mit Bernsteinsäure durchgeführt mit dem Ergebnis, daß die Bernsteinsäure im Leberdurchblutungsversuch ein Milchsäurebildner ist, und zwar wurde ein so erhebliches Plus an Milchsäurewerten gefunden, daß an einen quantitativen Übergang von Bernsteinsäure an Milchsäure zu denken war. Nun haben *Batelli* und *Stern*¹ die Beobachtung gemacht, daß die meisten Gewebe die Fähigkeit der Oxydation der Bernsteinsäure besitzen. Diese Oxydation vollzieht sich im Sinne der *Wielandschen* Dehydrierung durch einen „Succinoxydon“ genannten Katalysator. Das erste Produkt dieser Oxydation ist, wie *Thunberg*² und *Einbeck*³ zeigten, die Fumarsäure, die durch Wasseranlagerung in Äpfelsäure übergeht.

Die Endprodukte ergaben ungefähr 70% Äpfelsäure und 30% Fumarsäure. Digeriert man Lebergewebe mit Fumarsäure, so bildet sich annähernd das gleiche Verhältnis zwischen Äpfelsäure und Fumarsäure. Da nun auch für die Leber die Existenz des Succinoxydons anzunehmen ist, so müßte, wenn Bernsteinsäure in Milchsäure ihren Übergang fände, der Weg über die Fumarsäure und Äpfelsäure gehen. Da aber unsere Versuche zeigen, daß die Leberdurchblutung keinen Übergang von Fumarsäure oder Äpfelsäure in Milchsäure erkennen läßt, so ist mit der Wahrscheinlichkeit zu rechnen, daß die Bernsteinsäure bei der Durchblutung der Leber zu Fumarsäure bzw. Äpfelsäure oxydiert worden ist, und daß dadurch — zum mindesten zu einem Teile — die Milchsäurewerte sich aus der Acetaldehyd-
abspaltung dieser Säuren bei der Oxydation ableiten. Die Bernsteinsäure selbst ergibt bei der Oxydation mit KMnO_4 -Lösung keine Acetaldehyd-
abspaltung. Es wäre auch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die bei der Durchblutung im lebenden Gewebe entstehende Äpfelsäure die linksdrehende (und nicht die in unseren Versuchen verwandte), optisch inaktive Form ist, wofür Untersuchungen von *Dakin*⁴ sprechen, der auf die Ähnlichkeit von l-Äpfelsäure mit der d-Milchsäure hinwies, und daß die sterische

¹ *Batelli* und *Stern*, diese Zeitschr. **30**, 172, 1911.

² *T. Thunberg*, Zeitschr. f. Physiol. **81**, 98, 1916.

³ *Einbeck*, diese Zeitschr. **95**, 296, 1919.

⁴ *H. D. Dakin*, Oxydations and Reductions in the animal Body, 2. Aufl. London, Longmanns, Green and Co., 1922.

Konfiguration für den Ausfall der Ergebnisse mitbestimmend ist. Diese Frage bedarf einer eingehenden Analyse.

Wir haben schließlich noch das cis-trans-Isomere der Fumarsäure, die Maleinsäure, im Durchströmungsversuche untersucht:

III. Versuche mit Maleinsäure.

Versuch K (normale Hundeleber).

Im Vorversuch Durchblutung mit Warmblüterringerlösung, der im Hauptversuch 0,138 %iges maleinsaures Na (= 0,1 % Maleinsäure) zugesetzt wird.

Zahl der Durchströmungen	Zeit der Durchströmungen Min.	Glucose mg.°/o	Milchsäure mg.°/o	Milchsäure in Baryt-filtrat mg.°/o	Baryt-niederschlag als Milchsäure berechnet mg.°/o
Vorversuch.					
1	20	55	17		
2	20	57	17		
3	20	55	14	9	2
Hauptversuch (mit Durchströmung von 0,1 % Maleinsäure als Na-Salz).					
1	20	22	14		
2	20	20	15		
3	20	18	20	8	8

Trotz scheinbarer Zunahme des Milchsäurewertes im Hauptversuch, ist eine wirkliche Zunahme des Milchsäurewertes nach Maleinsäuredurchblutung, mithin ein Übergang von Maleinsäure in Milchsäure nicht nachweisbar.

Versuch L (normale Hundeleber).

Der gleiche Versuch wie der vorhergehende.

Zahl der Durchströmungen	Zeit der Durchströmungen Min.	Glucose mg.°/o	Milchsäure mg.°/o	Milchsäure in Baryt-filtrat mg.°/o	Baryt-niederschlag als Milchsäure berechnet mg.°/o
Vorversuch.					
1	20	51	14		
2	20	49	20		
3	20	54	22	12 mg	9
Hauptversuch (mit Durchströmung von 0,1 % Maleinsäure als Na-Salz).					
1	20	27	14		
2	20	35	16		
3	20		20	9	12

Auch hier ist keine Erhöhung des reellen, nicht einmal des virtuellen Milchsäurewertes nachzuweisen. Ein Übergang von Maleinsäure in Milchsäure in Leberdurchblutungsversuchen ist also nicht nachzuweisen. Von der Anführung weiterer Versuche sehen wir ab, da sie ein gleiches negatives Ergebnis haben.

Fassen wir das Resultat dieser Arbeit zusammen, so ließ sich weder ein Übergang von Äpfelsäure, noch Fumarsäure, noch Maleinsäure in Milchsäure bei Leberdurchblutungsversuchen nachweisen.

Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. (Brugsch und Horsters.)

XXIII. Mitteilung:

Milchsäurebildung in der Leber nach Durchströmungsversuchen mit d-Fructose.

Von

Y. Harada.

(Aus dem Laboratorium der II. medizinischen Klinik der Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 11. Juli 1927.)

Bei der Durchblutung von Lebern pankreasdiabetischer Tiere mit d-Fructoselösungen fanden *Emlden* und *Isaak*¹ eine Überführung der d-Fructose in Glykose. Wir haben nun eine Reihe von Versuchen an der durchströmten Leber normaler und pankreasdiabetischer Hunde angestellt, um den Übergang von d-Fructose in Milchsäure festzustellen.

Die Durchströmung der Leber des frisch entbluteten Hundes geschieht mit Ringerlösung, zunächst ohne Zusatz von Glucose bzw. d-Fructose. Die Temperatur ist 40° C. Der Durchströmungsdruck wird so reguliert, daß 1 Liter der verwendeten Durchströmungsflüssigkeit 20 Minuten braucht, um durch die Leber zu fließen. Nach dreimaliger Durchströmung im Vorversuch geschieht im Hauptversuch die Durchströmung mit der Ringerlösung, die den Glucose- bzw. d-Fructosezusatz enthält. Nach je 20 Minuten werden Proben entnommen zur Zuckerbestimmung nach *G. Bruhns*² bzw. Milchsäurebestimmung nach *Clausen-Meyerhof*.

A. Versuche an Lebern normaler Hunde.

Versuch I (normale Hundeleber).

Im Vorversuch Durchströmung mit Ringerlösung, im Hauptversuch Durchströmung mit 0,35%iger d-Fructoselösung.

Zahl der Durchströmungen	Zeitdauer der Durchströmungen Min.	Zucker als d-Fructose berechnet mg. ^o / ₁₀	Milchsäure mg. ^o / ₁₀
Vorversuch.			
1	20	143	61
2	20	180	74
3	20	223	112

¹ *Emlden* und *Isaak*, Zeitschr. f. phys. Chem. 99, 297, 1917.

² *G. Bruhns*, Jodometrische Zuckerbestimmung. Chem.-Ztg. 45, 486, 1921.

Zahl der Durchströmungen	Zeitdauer der Durchströmungen Min.	Zucker als d-Fructose berechnet mg-%	Milchsäure mg-%
Hauptversuch.			
1	20	56	186
2	20	64	254
3	20	80	236

Resultat. Die (glykogenhaltige) Leber schwemmt im Vorversuch Zucker aus (der hier zum Vergleich mit dem Hauptversuch auf d-Fructose aus den Reduktionswert umgerechnet worden ist), ebenso Milchsäure. Im Hauptversuch steigt der Milchsäurewert stark an (um 142 mg-%, gemessen nach dem höchsten Werte im Hauptversuch gegenüber dem höchsten Werte im Vorversuch). Der Anstieg geht über den d-Fructosewert, der 35 mg-% beträgt. Die Zuckerausschwemmung hält sich im Hauptversuch auf niedrigeren Werten als im Vorversuch.

Versuch II (normale Hundeleber).

Im Vorversuch Durchströmung mit Ringerlösung, im Hauptversuch Zusatz von 3%iger d-Fructose.

Zahl der Durchströmungen	Zeitdauer der Durchströmungen Min.	Zucker als d-Fructose berechnet mg-%	Milchsäure mg-%
Vorversuch.			
1	20	423	187
2	20	606	138
3	20	695	56
Hauptversuch.			
1	20	379	129
2	20	404	203
3	20	454	—

Starke Ausschüttung von Zucker im Vorversuch, geringere Ausschüttung im Hauptversuch. Im Hauptversuch nimmt die Milchsäureausschüttung zu.

Versuch III (normale Hundeleber).

Im Vorversuch Durchströmung mit Ringerlösung, im Hauptversuch Zusatz von 6%iger d-Fructose.

Zahl der Durchströmungen	Zeitdauer der Durchströmungen Min.	Zucker als d-Fructose berechnet mg-%	Milchsäure mg-%
Vorversuch.			
1	20	46	192
2	20	28	210
3	20	32	151

Zahl der Durchströmungen	Zeitdauer der Durchströmungen Min.	Zucker als d-Fructose berechnet mg.°/o	Milchsäure mg.°/o
--------------------------	---------------------------------------	---	----------------------

Hauptversuch.

1	20	448	164
2	20	429	148
3	20	414	206

Die (glykogenarme) Leber schwemmt im Vorversuch nur geringe Zuckermengen aus; im Hauptversuch bleibt der Zuckerwert hinter dem Zuckerwert der Ringerlösung zurück. Berücksichtigt man indessen die Milchsäurewerte, die im Vorversuch wie Hauptversuch annähernd gleich große sind, so ist im Hauptversuch der Zuckerwert plus dem Milchsäurewert annähernd so groß wie der d-Fructosewert der Ringerlösung. Eine Einsparung von d-Fructose ist leicht beweisbar.

Versuch IV (normale Hundeleber).

Im Vorversuch Durchströmung mit Ringerlösung, im Hauptversuch Zusatz von 10°/oiger d-Fructose.

Zahl der Durchströmungen	Zeitdauer der Durchströmungen Min.	Zucker als d-Fructose berechnet mg.°/o	Milchsäure mg.°/o
--------------------------	---------------------------------------	---	----------------------

Vorversuch.

1	20	278	189
2	20	384	185
3	20	513	164

Hauptversuch.

1	20	907	126
2	20	897	181
3	20	887	105

Die (glykogenreiche) Leber schwemmt reichlich Zucker aus, desgleichen Milchsäure. Im Hauptversuch ist der Milchsäurewert kleiner als im Vorversuch (durchschnittlich), der Zuckerwert hält sich unter dem d-Fructosewert der Ringerlösung; Zuckerwert plus Milchsäurewert erreicht im Hauptversuch den d-Fructosewert der Ringerlösung. Eine Einsparung von d-Fructose ist deshalb leicht beweisbar.

Als Gegenstück zu der Durchströmung mit d-Fructose führen wir zwei Versuche mit Glykosedurchströmung an.

Versuch V (normale Hundeleber).

Im Vorversuch Durchströmung mit Ringerlösung, im Hauptversuch Zusatz von 5 $\frac{0}{100}$ iger Glykose.

Zahl der Durchströmungen	Zeitdauer der Durchströmungen Min.	Glykose mg. $\frac{0}{100}$	Milchsäure mg. $\frac{0}{100}$
Vorversuch.			
1	20	299	105
2	20	402	144
3	20	474	203
Hauptversuch.			
1	20	598	109
2	20	696	101
3	20	769	109

Versuch VI (normale Hundeleber).

Im Vorversuch Durchströmung mit Ringerlösung, im Hauptversuch Zusatz von 10 $\frac{0}{100}$ iger Glykose.

Zahl der Durchströmungen	Zeitdauer der Durchströmungen Min.	Glykose mg. $\frac{0}{100}$	Milchsäure mg. $\frac{0}{100}$
Vorversuch.			
1	20	58	63
2	20	44	97
3	20	31	88
Hauptversuch.			
1	20	1085	67
2	20	995	109
3	20	905	155

Aus diesen beiden Versuchen ist ersichtlich, daß die Glykose- und Milchsäureausschwemmung einer (glykogenreichen) Leber zwar durch höhere Glykosekonzentration eingeschränkt, aber nicht völlig aufgehoben wird. Ein prinzipieller Unterschied zwischen der Durchströmung mit Glykose und d-Fructose ist in diesen Versuchen nicht auffindbar, doch läßt sich sagen, daß im allgemeinen die Milchsäurebildung in der durchströmten Leber unter d-Fructosedurchströmung größer ist als unter Glykose.

B. Versuche an Lebern pankreasdiabetischer Hunde.

Am 15. Dezember 1925 Pankreasexstirpation.

- „ 17. „ 1925 enthält der Harn 3,27 % Glykose.
 „ 18. „ 1925 1000 ccm Harn, 1,11 % Glykose.
 „ 19. „ 1925 Entblutung.

Versuch VII.

Durchblutung der pankreasdiabetischen Leber mit Ringerlösung; im Hauptversuch Zusatz von 3‰iger d-Fructose.

Zahl der Durchströmungen	Zeitdauer der Durchströmungen Min.	Zucker als d-Fructose berechnet mg.‰	Milchsäure mg.‰
Vorversuch.			
1	20	45	34
2	20	45	101
3	20	45	193
Hauptversuch.			
1	20	245	181
2	20	231	214
3	20	213	281

Resultat. Durchströmung mit d-Fructose steigert die Milchsäurebildung; eine Einsparung von d-Fructose ist nicht nachweisbar.

Versuch VIII.

6. Januar 1926 Pankreasexstirpation (Hund).

6. bis 7. Januar 1926 Harnmenge 150 ccm, 3,75% Glykose.

7. „ 8. „ 1926 Harnmenge 80 ccm, 4,44% Glykose.

9. Januar 1926 Entblutung.

Durchströmung der pankreasdiabetischen Leber mit Ringerlösung; im Hauptversuch Zusatz von 6,5‰iger d-Fructose.

Zahl der Durchströmungen	Zeitdauer der Durchströmungen Min.	Zucker als d-Fructose berechnet mg.‰	Milchsäure mg.‰
Vorversuch.			
1	20	0	37
2	20	0	54
3	20	0	77
Hauptversuch.			
1	20	539	117
2	20	524	140
3	20	509	208

Unter dem Einfluß der d-Fructose wird die *Milchsäureausschwemmung größer*; es läßt sich keine Einsparung von d-Fructose nachweisen. Die Zunahme der Milchsäure im Hauptversuch läßt sich zum Teil wohl auf Zersetzung der d-Fructose zurückführen.

Versuch IX.

Am 22. Januar 1926 Pankreasexstirpation (Hund).

„ 26. „ 1926 Harnzucker 10,2 % bei 230 ccm Harnmenge.

„ 27. „ 1926 Harnmenge 280 ccm, Glykose 9,7 %.

„ 27. „ 1926 Entblutung.

Durchströmung der Leber mit Ringerlösung; im Hauptversuch Zusatz von 4,0⁰/₁₀₀iger Glykose.

Zahl der Durchströmungen	Zeitdauer der Durchströmungen Min.	Glykose mg. ⁰ / ₁₀	Milchsäure mg. ⁰ / ₁₀
Vorversuch.			
1	20	0	1,4
2	20	0	2,3
3	20	0	3,6
Hauptversuch.			
1	20	412	1,4
2	20	407	5,0
3	20	392	4,5

Im Gegensatz zur Durchströmung mit d-Fructose läßt sich hier aus Glykose *keine* Milchsäurebildung nachweisen.

Zusammenfassend darf man schließen, daß sowohl die normale wie die pankreasdiabetische Leber unter d-Fructosedurchströmung mehr Milchsäure bildet als unter Glykose.

Studien über intermediären Kohlehydratumsatz.

(Brugsch und Horsters.)

XXIV. Mitteilung:

Über die mangelnde Beeinflußbarkeit der Mutarotation der Glucose und d-Fructose durch Insulin.

Von

Paul Radt.

(Aus dem Laboratorium der II. medizinischen Klinik der Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 11. Juli 1927.)

Die folgenden Untersuchungen sollen feststellen, ob Insulin bei Zusatz von Phosphorsäuren und Alkalien einen Einfluß auf die Mutarotation der α - und β -Glucose ausüben. Es wäre nämlich an sich denkbar, daß diese Stoffe, die doch im Kohlehydratstoffwechsel eine bedeutende Rolle spielen, auch hier Änderungen hervorrufen, z. B. die Geschwindigkeit der Umsetzungen oder das endgültige Gleichgewicht beeinflussen.

Um Genauigkeit zu erreichen, wurde nur mit abgekochtem, destilliertem Wasser von 18° Temperatur gearbeitet. Die Drehungswinkel wurden im 1-dcm-Polarimeterrohr beobachtet. Für jeden Wert wurden zehn Ablesungen gemacht und daraus das Mittel gezogen. In einigen Fällen, wo sich der Winkel ganz besonders schnell änderte, mußten wir uns mit fünf, manchmal sogar mit nur zwei Ablesungen begnügen.

Mutarotation der α -Glucose in reinem destillierten Wasser.

Tabelle I.

α -Glucose 0,1

Aqua dest. 10,1

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
4'	+ 1,021°	91'	+ 0,659°
18	+ 0,919	120	+ 0,601
29	+ 0,859	150	+ 0,568
61	+ 0,739	24h	+ 0,525

Nach 4 Stunden ist der Wert von $+0,525^0$ erreicht, der auch nach weiteren 24 Stunden noch der gleiche ist.

Der nächste Versuch sollte das Verhalten der Mutarotation der α -Glucose in einer Ringerflüssigkeit feststellen. Wir nahmen zu diesem Zwecke die gewöhnliche neutrale Durchströmungsflüssigkeit, die im Liter

6,0 g NaCl,

0,1 g KCl,

0,1 g CaCl_2

enthält, und lösten in 10 ccm dieser Lösung 0,1 g α -Glucose.

α -Glucose 0,1

Ringerflüssigkeit 10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
4'	$+1,022^0$	90'	$+0,661^0$
20	$+0,909$	125	$+0,594$
30	$+0,854$	150	$+0,567$
59	$+0,745$	24h	$+0,525$

Danach ändert die Ringerlösung *nicht* die Mutationskurve der α -Glucose.

Die nächste Versuchsanordnung beobachtet das Verhalten der α -Glucose in saurer Lösung, nämlich bei Zusatz von primärem Kaliumphosphat.

Tabelle II.

Glucose 0,1

KH_2PO_4 0,1

Aqua dest. 10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
3'	$+0,971^0$	63'	$+0,546^0$
20	$+0,747$	80	$+0,532$
33	$+0,647$	93	$+0,525$
45	$+0,590$	24h	$+0,525$

Schon nach 3 Minuten sehen wir einen tieferen Wert als in den ersten Versuchen, und der steilere Abfall der Kurve sagt uns, daß die Umwandlung der α - in die β -Glucose unter dem Einfluß des sauren Salzes schneller vor sich geht. Hier ist schon nach 93 Minuten das Gleichgewicht eingetreten, und man erhält denselben Endwert von $+0,525^0$ wie in den vorhergehenden Versuchen.

Im folgenden ersetzen wir ein Drittel des zugegebenen primären durch sekundäres Kaliumphosphat.

Tabelle III.

α -Glucose	0,1
KH_2PO_4	0,066 . . .
K_2HPO_4	0,033 . . .
Aqua dest.	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
3'	+ 0,920 ⁰	18'	+ 0,600 ⁰
5	+ 0,858	26	+ 0,550
7	+ 0,802	41	+ 0,525
10	+ 0,728	24 ^h	+ 0,525
13	+ 0,670		

Die Kurve fällt noch steiler ab als die vorhergehende, und der Endwert ist hier schon nach 41 Minuten erreicht.

Darauf ersetzen wir ein weiteres Drittel des primären Phosphats durch sekundäres.

Tabelle IV.

α -Glucose	0,1
KH_2PO_4	0,033 . . .
K_2HPO_4	0,066 . . .
Aqua dest.	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,940 ⁰	11'	+ 0,555 ⁰
5	+ 0,778	13	+ 0,527
6	+ 0,723	14	+ 0,525
7	+ 0,693	24 ^h	+ 0,525
8	+ 0,650		

Wir sehen, daß die Umwandlung noch schneller vor sich geht. Das Gleichgewicht zwischen α - und β -Glucose ist schon nach 14 Minuten hergestellt.

Nun verfolgen wir den Gang der Mutarotation in einer Lösung, die nur sekundäres Kaliumphosphat enthält.

Tabelle V.

α -Glucose	0,1
K_2HPO_4	0,1
Aqua dest.	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
3'	+ 0,770 ⁰	8'	+ 0,552 ⁰
4	+ 0,676	10	+ 0,527
5	+ 0,632	11	+ 0,525
6	+ 0,601	24 ^h	+ 0,525

In diesem alkalischen Milieu setzt sich die α -Glucose noch viel schneller in β -Glucose um, wie es der sehr steile Verlauf unserer Kurve zeigt. Schon nach 11 Minuten ist der Wert von $+0,525^{\circ}$ erreicht.

Jetzt ließen wir die phosphorsauren Salze ganz weg und untersuchten die α -Glucose in n/10 und n/100 Natronlauge, wir stellten uns aus ihnen 1%ige α -Glucoselösungen her.

Tabelle VI.

α -Glucose 0,1
n/10 NaOH 10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,525 ^o
24h	+ 0,525

Tabelle VIa.

α -Glucose 0,1
n/100 NaOH 10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,525 ^o
24h	+ 0,525

Unter der Einwirkung dieser schwachen Alkalilösungen scheint die Umwandlung der α -Glucose in die β -Form fast augenblicklich zu erfolgen, denn schon bei der ersten Ablesung, die den Wert von $+0,525^{\circ}$ ergibt, zeigt sich, daß das Gleichgewicht bereits hergestellt ist; eine kurvenmäßige Darstellung müßte also eine fast senkrechte Linie zeichnen.

Hiermit schließt die erste Versuchsreihe über das Verhalten der Mutarotation der α -Glucose. Es zeigt sich, daß sie in neutraler Lösung langsam erfolgt, schneller in saurer, noch schneller in schwach alkalischer, mit zunehmender Alkaleszenz aber erheblich beschleunigt wird. Stets verläuft die Umsetzungskurve erst steiler, um sich allmählich abzuflachen, wobei in allen Fällen dasselbe Gleichgewicht bei $+0,525^{\circ}$ erreicht wird.

Es folgen nun dieselben *Versuche unter Zusatz von Insulin*, um festzustellen, ob dieses etwa die Schnelligkeit der Umsetzungen oder den Gleichgewichtspunkt beeinflusst. Wir benutzten Trockeninsulin. Zuerst sahen wir zu, ob nicht die reine wässrige Insulinlösung optisch aktiv wäre. Hierbei stellte sich heraus, daß unser Insulin die Ebene des polarisierten Lichtes nach links drehte, und zwar ergab sich für

0,01 g Insulin in 10 ccm eine Drehung von $-0,08^{\circ}$,
0,005 g „ „ 10 „ „ „ „ $-0,04^{\circ}$,
0,001 g „ „ 10 „ „ „ „ $-0,008^{\circ}$.

Insulin¹ macht also eine Linksdrehung, die proportional der gelösten Menge ist.

Nun setzten wir diese Insulinmengen von 0,01 bzw. 0,005 bzw. 0,001 g Insulin zu unserer frisch bereiteten 1%igen wässrigen α -Glucoselösung zu und beobachteten den Verlauf der Umsetzung.

Tabelle VII.

α -Glucose 0,1
Aqua dest. 10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswinkel im 1-dcm-Rohr bei Zusatz von		
	0,01 g Insulin	0,005 g Insulin	0,001 g Insulin
4'	+ 0,941 ⁰	+ 0,981 ⁰	+ 1,013 ⁰
18	+ 0,839	+ 0,878	+ 0,919
29	—	+ 0,819	+ 0,851
30	+ 0,779	—	—
59	—	—	+ 0,729
60	+ 0,662	+ 0,699	—
90	+ 0,579	+ 0,619	+ 0,651
120	+ 0,519	+ 0,559	+ 0,591
150	+ 0,489	—	—
180	—	+ 0,509	+ 0,541
210	—	+ 0,491	+ 0,523
24h	+ 0,445	+ 0,485	+ 0,517

Wir stellen fest, daß die Kurve mit der unserer ersten Versuche ohne Insulin völlig identisch verläuft. Die Geschwindigkeit der Umwandlung von α - in β -Glucose wird demnach von Insulin in wässriger Lösung nicht beeinflußt. Wir können nur feststellen, daß in diesem Versuche die einzelnen Werte und Endwerte etwas niedriger sind, als in dem entsprechenden ohne Insulin, und zwar um so niedriger, je mehr Insulin zugesetzt war. Wir sehen aber sofort, daß diese Verminderung des Drehungswinkels genau der Linksdrehung des zugesetzten Insulins entspricht. Es wird also auch der Gleichgewichtspunkt durch Insulin in wässriger Lösung nicht geändert. Da unser letzter Versuch uns gezeigt hatte, daß es auf die Menge des zugegebenen Insulins überhaupt nicht ankommt, setzten wir bei folgenden Versuchen stets nur 0,01 g Insulin zu. Sie sind Paralleluntersuchungen zu den Versuchen Ia bis VI.

Wir untersuchten zunächst den Einfluß des Insulins auf die in Ringerflüssigkeit gelöste α -Glucose.

¹ Diese Aussage bezieht sich auf ein von der Firma C. A. F. Kahlbaum uns zur Verfügung gestelltes Trockeninsulin, welches etwa 4 bis 6 E. im mg enthält.

Tabelle VIIa.

α -Glucose	0,1
Ringerflüssigkeit	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswinkel im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswinkel im 1-dcm-Rohr
4'	+ 0,941 ⁰	90'	+ 0,580 ⁰
18	+ 0,839	120	+ 0,519
30	+ 0,779	150	+ 0,489
60	+ 0,663	24h	+ 0,445

Es zeigt sich völlige Übereinstimmung mit dem vorhergehenden Versuche. Die Mutarotation der α -Glucose, die ohne Insulin in Wasser und Ringerflüssigkeit identisch verlief, zeigt diese Übereinstimmung auch bei Insulinzusatz. Es ändert also auch in Ringerlösung Insulin den Ablauf der Mutarotation der α -Glucose nicht.

Dann folgt die Untersuchung des Insulineinflusses auf die α -Glucoselösung unter Zusatz von primärem Kaliumphosphat.

Tabelle VIII.

α -Glucose	0,1
KH_2PO_4	0,1
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
3'	+ 0,891 ⁰	63'	+ 0,466 ⁰
20	+ 0,665	78	+ 0,452
33	+ 0,569	93	+ 0,445
45	+ 0,511	24h	+ 0,455

Hierauf wurde die Mutarotation unter Insulin für eine Lösung verfolgt, die zwei Drittel primäres und ein Drittel sekundäres Kaliumphosphat enthielt.

Tabelle IX.

α -Glucose	0,1
KH_2PO_4	0,066 ...
K_2HPO_4	0,033 ...
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
3'	+ 0,841 ⁰	18'	+ 0,520 ⁰
5	+ 0,775	26	+ 0,469
7	+ 0,720	41	+ 0,445
10	+ 0,645	24h	+ 0,445
13	+ 0,588		

Darauf beobachteten wir den Insulineinfluß auf die α -Glucoselösung mit $\frac{1}{3}$ primärem und $\frac{2}{3}$ sekundärem Kaliumphosphat.

Tabelle X.

α -Glucose	0,1
KH_2PO_4	0,033 . . .
K_2HPO_4	0,066 . . .
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,860°	11'	+ 0,474°
5	+ 0,700	13	+ 0,447
6	+ 0,643	14	+ 0,445
7	+ 0,611	24h	+ 0,445
8	+ 0,571		

Im folgenden Versuche setzten wir Insulin zu der Lösung, die nur sekundäres Kaliumphosphat enthielt.

Tabelle XI.

α -Glucose	0,1
K_2HPO_4	0,1
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
3'	+ 0,691°	8'	+ 0,473°
4	+ 0,597	10	+ 0,448
5	+ 0,553	11	+ 0,445
6	+ 0,521	24h	+ 0,445

Schließlich untersuchten wir den Einfluß des Insulins auf $n/10$ und $n/100$ Natronlauge, die α -Glucose gelöst enthält.

Tabelle XII.

α -Glucose	0,1
$n/10 \text{ NaOH}$	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,445°
24h	+ 0,445

Tabelle XIIa.

α -Glucose	0,1
n/100 NaOH	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,445°
24h	+ 0,445

Vergleichen wir diese Versuche (VIII bis XII a) mit denen der ersten Reihe (II bis VI), so ergibt sich eine völlige Übereinstimmung: Die Kurven verlaufen gleich. Die Geschwindigkeit der Umwandlung ist die gleiche wie in den entsprechenden Versuchen ohne Insulin, und ebenso stellt sich das Gleichgewicht auf denselben Wert ein.

Es ist somit festgestellt, daß Insulin keinen Einfluß auf die Mutation der α -Glucose hat.

Nun galt es, das Verhalten der β -Glucose zu beachten.

Diese stellten wir uns selbst aus der α -Glucose her: Im Wasserbad wurde Pyridin auf etwa 90° erhitzt und in dieses so lange α -Glucose gegeben, bis die Lösung völlig gesättigt war. Diese Lösung wurde heiß filtriert und das Filtrat im Eisschrank abgekühlt. Dabei fiel eine weiße Masse aus. Nach dem Abgießen der überstehenden Pyridinlösung wurde der Bodensatz erst mit Fließpapier, dann im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. So erhielten wir ein weißes kristallinisches Pulver, das stark nach Pyridin roch. Das Pyridin verflüchtigt sich beim Stehen an der Luft und es bleibt reine β -Glucose als feines weißes, geruchloses Pulver zurück.

Diese β -Glucose untersuchten wir ebenso wie die α -Glucose zuerst in destilliertem Wasser und dann in Ringerflüssigkeit.

Tabelle XIII.

β -Glucose	0,1
Aqua dest.	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
5'	+ 0,327°	64'	+ 0,512°
19	+ 0,410	79	+ 0,521
34	+ 0,465	94	+ 0,525
50	+ 0,496	24h	+ 0,525

Tabelle XIIIa.

β -Glucose 0,1
 Ringerflüssigkeit 10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
5'	+ 0,326 ⁰	63'	+ 0,510 ⁰
20	+ 0,414	80	+ 0,521
35	+ 0,467	95	+ 0,525
50	+ 0,497	24h	+ 0,525

Zunächst stellen wir fest, daß die Umwandlung in Wasser und in Ringerflüssigkeit völlig gleich verläuft. Die Kurve steigt langsam an, um sich mehr und mehr abzuflachen. Das Gleichgewicht ist schon nach 94 Minuten erreicht, es scheint also die Umwandlung der β - in die α -Form leichter vor sich zu gehen als umgekehrt. Das Gleichgewicht liegt am selben Punkte von + 0,525⁰.

Dann beobachteten wir in primärer Kaliumphosphatlösung.

Tabelle XIV.

β -Glucose 0,1
 KH_2PO_4 0,1
 Aqua dest. 10,0
 Insulin 0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
5'	+ 0,320 ⁰	38'	+ 0,485 ⁰
7	+ 0,345	47	+ 0,505
10	+ 0,374	60	+ 0,520
14	+ 0,398	75	+ 0,525
26	+ 0,451	24h	+ 0,525

Im Vergleich zur wässerigen Lösung ist die Mutarotation mäßig beschleunigt.

Jetzt ersetzen wir ein Drittel des primären Kaliumphosphats durch sekundäres.

Tabelle XV.

β -Glucose 0,1
 KH_2PO_4 0,066 ...
 K_2HPO_4 0,033 ...
 Aqua dest. 10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
3'	+ 0,325 ⁰	20'	+ 0,504 ⁰
5	+ 0,372	30	+ 0,524
7	+ 0,404	40	+ 0,525
10	+ 0,438	24h	+ 0,525
15	+ 0,476		

Wir sehen die Umwandlung erheblich schneller vor sich gehen.

Dann ersetzen wir ein zweites Drittel primären Kaliumphosphats durch sekundäres.

Tabelle XVI.

β -Glucose	0,1
KH_2PO_4	0,033 . . .
K_2HPO_4	0,066 . . .
Aqua dest.	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,360 ⁰	11'	+ 0,509 ⁰
3	+ 0,390	15	+ 0,524
4	+ 0,416	20	+ 0,525
5	+ 0,438	24h	+ 0,525
7	+ 0,472		

Schließlich untersuchten wir in reiner sekundärer Kaliumphosphat-lösung.

Tabelle XVII.

β -Glucose	0,1
K_2HPO_4	0,1
Aqua dest.	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,380 ⁰	7'	+ 0,499 ⁰
3	+ 0,421	12	+ 0,525
5	+ 0,472	24h	+ 0,525

Wir können wieder feststellen, daß zunehmende Alkaleszenz die Geschwindigkeit der Umwandlung steigert.

Endlich lösten wir die β -Glucose in n/10 und n/100 Natronlauge.

Tabelle XVIII.

β -Glucose	0,1
n/10 NaOH	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,525 ⁰
24h	+ 0,525

Tabelle XVIIIa.

β -Glucose	0,1
n/100 NaOH	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,525°
24h	+ 0,525

Wie die Umwandlung der α -Glucose unter diesem Einfluß der schwachen Natronlauge augenblicklich zu erfolgen schien, können wir auch bei der β -Glucose schon bei der ersten Ablesung feststellen, daß das Gleichgewicht bereits erreicht ist.

Vergleichen wir die Untersuchungen der α -Glucose mit denen der β -Form, so finden wir große Übereinstimmungen: Am flachsten verläuft die Kurve bei Lösung in Wasser bzw. Ringerflüssigkeit, steiler in saurem Milieu. Mit zunehmender Alkaleszenz des Lösungsmittels nimmt auch die Steilheit der Kurve zu, um denselben Endwert zu erreichen. In allen Fällen geht die Umwandlung zuerst schnell vor sich, um allmählich langsamer zu werden.

Die Unterschiede im Verhalten der α - und β -Form zeigen sich, wenn man ihr Verhalten in den entsprechenden Lösungen gegenüberstellt. Dabei sehen wir, daß die β -Form in Wasser und Ringerflüssigkeit erheblich schneller auf ihren Endwert kommt als die α -Form. Dieser Unterschied ist nicht mehr erheblich in saurer Lösung. Bei Alkalizusatz setzt sich die α -Form schneller um als die β -Form, es verzögert sich also die Umsetzung der β -Glucose, die sonst schneller vor sich geht als die der α -Glucose, unter Alkalieinwirkung im Vergleich zu dieser.

Jetzt stellten wir die Versuche 13 bis 18a nochmals an unter Zusatz von Insulin, um zu sehen, ob dieses bei der β -Glucose Änderungen im Verlaufe der Mutarotation hervorruft.

Zuerst setzten wir 0,01 g Insulin der wässrigen β -Glucoselösung zu.

Tabelle XIX.

β -Glucose	0,1
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
5'	+ 0,246°	64'	+ 0,431°
19	+ 0,329	79	+ 0,441
34	+ 0,385	94	+ 0,445
50	+ 0,418	24h	+ 0,445

Es ergibt sich völlige Übereinstimmung mit dem entsprechenden Versuche ohne Insulin. Nur liegen die einzelnen Werte gemäß der Linksdrehung des Insulins etwas tiefer.

Dann der Verlauf der Kurve in Ringerflüssigkeit und Insulin.

Tabelle XIXa.

β -Glucose	0,1
Ringerflüssigkeit	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
5'	+ 0,247 ⁰	63'	+ 0,430 ⁰
20	+ 0,334	80	+ 0,442
35	+ 0,387	95	+ 0,445
50	+ 0,418	24h	+ 0,445

Wir können feststellen, daß dieser Versuch mit dem vorhergehenden übereinstimmt, es also auch bei Insulinzusatz gleich ist, ob zur Lösung der β -Glucose Wasser oder Ringerflüssigkeit verwendet wird.

Es folgen die Untersuchungen des Insulineinflusses auf die β -Glucoselösungen unter Zusatz von Kaliumphosphaten.

Saures Kaliumphosphat.

Tabelle XX.

β -Glucose	0,1
KH_2PO_4	0,1
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
5'	+ 0,240 ⁰	38'	+ 0,405 ⁰
7	+ 0,266	47	+ 0,423
10	+ 0,294	60	+ 0,440
14	+ 0,318	75	+ 0,445
26	+ 0,371	24h	+ 0,445

Dann in einer Lösung von $\frac{2}{3}$ primärem und $\frac{1}{3}$ sekundärem Phosphat.

Tabelle XXI.

β -Glucose	0,1
KH_2PO_4	0,066 . . .
K_2HPO_4	0,033 . . .
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
3'	+ 0,245 ⁰	20'	+ 0,424 ⁰
5	+ 0,294	30	+ 0,443
7	+ 0,326	40	+ 0,445
10	+ 0,360	24h	+ 0,445
15	+ 0,398		

Hierauf in einer Lösung, die $\frac{1}{3}$ primäres und $\frac{2}{3}$ sekundäres Phosphat enthielt.

Tabelle XXII.

β -Glucose	0,1
KH_2PO_4	0,033 . .
K_2HPO_4	0,066 . . .
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,281 ⁰	7'	+ 0,394 ⁰
3	+ 0,311	11	+ 0,430
4	+ 0,337	15	+ 0,445
5	+ 0,360	24h	+ 0,445

Darauf folgen die Untersuchungen im sekundären Kaliumphosphat.

Tabelle XXIII.

β -Glucose	0,1
K_2HPO_4	0,1
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,301 ⁰	7'	+ 0,420 ⁰
3	+ 0,341	12	+ 0,445
5	+ 0,381	24h	+ 0,445

Schließlich untersuchten wir in n/10 und n/100 Natronlauge.

Tabelle XXIV.

β -Glucose	0,1
n/10 NaOH	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,445 ⁰
24h	+ 0,445

Tabelle XXIVa.

β -Glucose	0,1
n/100 NaOH	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	+ 0,445 ⁰
24h	+ 0,445

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit den Versuchen 14 bis 18a können wir wiederum vollkommene Übereinstimmung in allen Punkten feststellen. Die entsprechenden Kurven verlaufen völlig gleich. Es ergibt sich also, daß auch die Mutarotation der β -Glucose in keiner Weise vom Insulin beeinflußt wird.

Es folgen die Untersuchungen der *Mutarotation der Lävulose*.

Wir gingen analog den Versuchen mit Glucose vor und beobachteten zunächst das Verhalten der Lävulose in wässriger Lösung.

Tabelle XXV.

Lävulose	0,1
Aqua dest.	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
3'	— 1,111 ⁰	10'	— 0,928 ⁰
4	— 1,042	17	— 0,910
5	— 1,000	24h	— 0,910
7	— 0,951		

Wir erhalten eine steil abfallende Kurve. Schon nach 17 Minuten ist das Gleichgewicht eingetreten. Die Umwandlungen der beiden Lävuloseformen ineinander scheinen also erheblich leichter vor sich zu gehen als bei der Glucose.

Dann lösten wir die Lävulose in Ringerflüssigkeit.

Tabelle XXVa.

Lävulose 0,1
 Ringerflüssigkeit 10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
3'	— 1,112 ⁰	10'	— 0,928 ⁰
4	— 1,042	17	— 0,910
5	— 1,001	24h	— 0,910
7	— 0,952		

Wir sehen auch hier wieder, daß es keinen Unterschied macht, ob man zur Lösung der Zucker Wasser oder Ringerflüssigkeit nimmt, die Kurven verlaufen gleich.

Dann setzten wir zur wässerigen Lävuloselösung primäres Kaliumphosphat.

Tabelle XXVI.

Lävulose 0,1
 KH_2PO_4 0,1
 Aqua dest. 10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	— 1,111 ⁰	6'	— 0,932 ⁰
3	— 1,050	9	— 0,910
4	— 0,995	24h	— 0,910
5	— 0,958		

Es ergibt sich eine starke Beschleunigung der Umwandlung, denn das Gleichgewicht ist schon nach 9 Minuten erreicht.

Jetzt ersetzen wir $\frac{1}{3}$ primäres Kaliumphosphat durch sekundäres.

Tabelle XXVII.

Lävulose 0,1
 KH_2PO_4 0,066...
 K_2HPO_4 0,033...
 Aqua dest. 10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	— 0,910 ⁰
24h	— 0,910

Wir sehen, daß unter dem Einfluß des basischen Salzes die Umwandlung augenblicklich vor sich geht. Schon bei der ersten Ablesung ist der Endwert erreicht.

Dasselbe ergab sich nun, als wir ein weiteres Drittel des sauren Salzes durch das basische ersetzen.

Tabelle XXVIII.

Lävulose	0,1
KH_2PO_4	0,033...
K_2HPO_4	0,066...
Aqua dest.	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	— 0,91°
24h	— 0,91

Dasselbe in reiner sekundärer Kaliumphosphatlösung.

Tabelle XXIX.

Lävulose	0,1
K_2HPO_4	0,1
Aqua dest.	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	— 0,91°
24h	— 0,91

Das gleiche Resultat erhielten wir, als wir die Lävulose in n/10 und n/100 Natronlauge untersuchten.

Tabelle XXX.

Lävulose	0,1
n/10 NaOH	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	— 0,91°
24h	— 0,91

Tabelle XXXa.

Lävulose	0,1
n/100 NaOH	10,0

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	— 0,91°
24h	— 0,91

Der Übergang der α -Lävulose in die β -Form bis zur Erreichung des Gleichgewichtszustandes scheint im Vergleich zu den Glucosen viel leichter vor sich zu gehen.

Darauf wiederholten wir die Versuche 25 bis 30a unter Insulinzusatz.

Tabelle XXXI (vgl. Kurve III, 3).

Lävulose	0,1
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
3'	— 1,191 ⁰	10'	— 1,007 ⁰
4	— 1,123	17	— 0,990
5	— 1,082	24h	— 0,990
7	— 1,032		

Wieder läßt Insulin die Umsetzungen unbeeinflusst, die Kurven verlaufen gleich.

Der nächste Versuch untersucht den Einfluß des Insulins auf die in Ringerflüssigkeit gelöste Lävulose.

Tabelle XXXIa.

Lävulose	0,1
Ringerflüssigkeit	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
3'	— 1,191 ⁰	10'	— 1,008 ⁰
4	— 1,122	17	— 0,990
5	— 1,080	24h	— 0,990
7	— 1,031		

Auch hier ergibt sich, daß Insulin ohne jeden Einfluß bleibt.

Dann setzten wir Insulin zur Lösung, die primäres Kaliumphosphat enthielt.

Tabelle XXXII.

Lävulose	0,1
KH_2PO_4	0,1
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr	Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	— 1,190 ⁰	6'	— 1,012 ⁰
3	— 1,129	9	— 0,990
4	— 1,075	24h	— 0,990
5	— 1,039		

Insulin zeigt keine Änderung des Verlaufs der Mutarotation.

Auch die augenblickliche Umsetzung unter Alkalizusatz konnte Insulin nicht beeinflussen.

Tabelle XXXIII.

Lävulose	0,1
KH_2PO_4	0,066...
K_2HPO_4	0,033...
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	— 0,990 ⁰
24h	— 0,990

Tabelle XXXIV.

Lävulose	0,1
KH_2PO_4	0,033...
K_2HPO_4	0,066...
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	— 0,990 ⁰
24h	— 0,990

Tabelle XXXV.

Lävulose	0,1
K_2HPO_4	0,1
Aqua dest.	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	— 0,990 ⁰
24h	— 0,990

Tabelle XXXVI.

Lävulose	0,1
n/10 NaOH	•10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	— 0,990 ⁰
24h	— 0,990

Tabelle XXXVIa.

Lävulose	0,1
n/100 NaOH	10,0
Insulin	0,01

Zeit der Ablesung nach Beginn	Drehungswert im 1-dcm-Rohr
2'	— 0,990 ⁰
24h	— 0,990

Die Versuchsreihen über Lävulose mit und ohne Insulinzusatz zeigen, daß die Mutarotation der Lävulose unter den von uns gegebenen Bedingungen von Insulin nicht beeinflußt wird.

Wenn wir unsere Versuchsergebnisse zusammenfassen, so läßt sich sagen, daß bei unseren Reagenzglasversuchen Insulin unter den verschiedensten Bedingungen auf die Mutarotation der Glucose und der Lävulose ohne Einfluß bleibt. Insulin läßt die Geschwindigkeit der Umwandlung von einer Zucker-Form in die andere unberührt und stört nicht das Gleichgewicht zwischen den α - und β -Formen.

Quantitative Untersuchungen über den Abbau von Aminosäuren und Aminopurinen durch Methylglyoxal und verwandte Substanzen¹.

Von

Carl Neuberg und Maria Kobel.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Der enge Zusammenhang zwischen Kohlenhydrat- und Eiweißumsatz tritt im Stoffwechsel der autotrophen Pflanzen am sinnfälligsten zutage. Aus den durch Assimilation gebildeten Kohlenhydraten und aus Ammonsalzen entstehen Aminosäuren, wobei die durch Veratmung oder Vergärung von Zucker gewonnene Energie den Eintritt der Reaktion ermöglicht. Auch bei heterotrophen Vegetabilien ist eine solche Beziehung unverkennbar, wie seit *Pasteurs* Fundamentalversuch über die Eiweißsynthese durch Hefe und ähnliche Organismen bekannt ist. Eine neue Seite dieses Gegenstandes enthüllten die grundlegenden Untersuchungen von *F. Ehrlich*². Für das hier zu behandelnde Problem ist die Tatsache von Belang, daß jede der Hefe als einzige Stickstoffnahrung gebotene Aminosäure zunächst desaminiert wird, und daß dann das hierbei in Freiheit gesetzte Ammoniak zusammen mit dem Kohlenhydrat zu Protoplasmabildung dient; die dazu erforderliche Energie wird durch eine gleichzeitig ablaufende alkoholische Zuckerspaltung bereitgestellt. Wegen vieler anderer Berührungen, die zwischen Eiweiß- und Kohlenhydratstoffwechsel vorhanden sind, sei nur noch des Befundes gedacht, daß die primären Abbauprodukte der Eiweißbausteine, die α -Ketosäuren, und deren sekundäre Zerfallsprodukte, die Aldehyde, allesamt zu den stärksten Aktivatoren des desmolytischen Kohlenhydratverbrauches zählen³. Auch für den tierischen Stoffwechsel

¹ Vorgetragen in der Sitzung der Deutschen Chemischen Gesellschaft am 16. Mai 1927.

² *F. Ehrlich*, diese Zeitschr. 1, 8, 1906; 2, 52, 1907; 8, 438, 1908.

³ *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 88, 145, 1918; *C. Neuberg* und *M. Ehrlich*, ebendasselbst 101, 239, 1920; *C. Neuberg* und *M. Sandberg*, ebendasselbst 109, 290, 1920.

sind Verknüpfungen von Eiweiß- und Kohlenhydratumsatz seit langem bekannt; erinnert sei an die Frage nach der Bildung von Zucker aus dem Eiweiß.

Neuerdings ist diesen Zusammenhängen eine besondere Aufmerksamkeit geschenkt im Hinblick auf die Vorgänge bei den lebenswichtigen Erscheinungen der Glykolyse und Atmung. Es hat sich nämlich gezeigt, daß diese Stoffwechselprozesse von einer Entstehung von Ammoniak begleitet sind, und wir verweisen hinsichtlich der ganzen sich ergebenden Probleme auf die Untersuchungen von *Cathcart*, *Gad-Andersen*, *Lee*, *Tashiro*, *Warburg*, *Meyerhof*, *Embden*, *György*, *Parnas*, *Grafe*, *Winterstein* und deren Mitarbeitern. *O. Warburg*, *K. Posener* und *E. Negelein*¹ haben die Anschauung entwickelt, daß es sich bei der Wechselbeziehung zwischen Glykolyse und Auftreten von Ammoniak um einen chemischen Vorgang handelt. Bei der Atmung des Zwerchfells führen *O. Meyerhof*, *K. Lohmann* und *R. Meier*² das Freiwerden von Ammoniak auf eine Oxydation von Organeiprotein sowie im Falle der Leber auf eine Desaminierung zugesetzter Proteinbausteine zurück. *G. Embden*³ vertritt die Ansicht, daß eine Desaminierung der Adenylsäure zur Inosinsäure das bei der Muskelkontraktion sich bildende Ammoniak liefert.

Ersichtlich herrscht keine Einigkeit über die Herkunft des Ammoniaks. Wie Ammoniakentwicklung und Kohlenhydratabbau miteinander verbunden sind, ist noch weniger geklärt.

Bei dieser Sachlage bietet nun eine Reaktion Interesse, über die wir vor einiger Zeit eine kurze Mitteilung gemacht haben⁴. Im Verlaufe unserer Versuche über die Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren und Zucker, die sich durch augenblicklich erfolgende Drehungsänderungen zu erkennen geben, sind wir dazu übergegangen, das notorische Spaltungsprodukt der Kohlenhydrate, das *Methylglyoxal*, in seinem Verhalten zu Aminosäuren zu studieren. Man gewahrt eine schnelle Beeinflussung der Drehung. Diese und namentlich die rasch einsetzende Verfärbung solcher Gemische von Aminosäuren und Methylglyoxal deutete auf eine tiefgreifende Reaktion hin.

Wir haben schon damals mitgeteilt, daß gleich dem Methylglyoxal das Phenylglyoxal, das Dimethylglyoxal⁵ und das Glyoxal selbst wirken, und daß die zunächst geprüfte Aminosäure Alanin durch andere Aminosäuren, aber auch durch Aminopurine ersetzt werden kann. Wir

¹ *O. Warburg*, *K. Posener* und *E. Negelein*, diese Zeitschr. 152, 334, 1924.

² *O. Meyerhof*, *K. Lohmann* und *R. Meier*, ebendaselbst 157, 482, 1925.

³ *G. Embden*, Klin. Wochenschr. 6, 628, 1927; *G. Embden* und *M. Zimmermann*, H. 167, 137, 1927.

⁴ *C. Neuberg* und *M. Kobel*, diese Zeitschr. 185, 477, 1927.

⁵ Dieses Stoffwechselprodukt erlangt damit eine neue Bedeutung.

haben den Vorgang quantitativ in einer größeren Anzahl von Fällen verfolgt und berichten im folgenden über die Verhältnisse bei der *Einwirkung von Methylglyoxal auf Alanin, Amino-iso-buttersäure, Leucin, Phenylamino-essigsäure, Cystin, auf Hefeneiweißkörper, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glykokoll, Lysin, Arginin, Guanidin, Kreatin, Kreatinin, Adenin, Guanin* sowie *Guanosin*. Weiter machen wir Angaben über die analogen Vorgänge, die sich beim Zusammentreffen von *Phenylglyoxal* mit *Alanin* und *Glykokoll* abspielen.

Die Reaktion besteht in einer Desaminierung des verwendeten stickstoffhaltigen Materials, wobei im Falle der einfachen Aminosäuren außer Ammoniak und Kohlendioxyd der um ein Kohlenstoffatom ärmere Aldehyd (bzw. das Keton der nächst niederen Kohlenstoffreihe) auftritt. Es liegt am nächsten, den Vorgang als verwandt mit der Erscheinung zu betrachten, die *Wilhelm Traube*¹ beobachtet hat. Sie beruht auf der Umsetzung von Chinon mit Phenylaminoessigsäure. Der Autor hat in einer bedeutsamen Arbeit gezeigt, daß Phenylaminoessigsäure durch das Chinon in Benzaldehyd verwandelt wird. Wohl in der Voraussetzung, daß Chinon gleichzeitig zu Hydrochinon reduziert wird, hält *Traube* die Erscheinung für vergleichbar mit der alten Reaktion von *Strecker*². Seit *L. C. Maillards* bekannten Untersuchungen aus dem Jahre 1911 ist wiederholt auf die Reaktion zwischen Aminosäuren und höheren Zuckerarten aufmerksam gemacht worden, so von *C. J. Lintner*³ und *W. Ruckdeschel*⁴, *N. N. Iwanoff*⁵, *L. Grünhut* und *J. Weber*⁶, *S. Kostytschew* und *W. Brillant*⁷. Ganz abgesehen davon, daß die *Maillardsche* Reaktion unter solchen Bedingungen der Temperatur, der Konzentration und der Acidität eintritt, die kaum mit physiologischen Prozessen in eine Parallele gesetzt werden können, ist über das Wesen des Vorganges und über die Frage einer etwaigen Desaminierung der Aminosäuren nichts Zuverlässiges bekannt geworden; sicher scheint lediglich eine öfter nachgewiesene Entstehung der Kohlensäure zu sein.

Wählt man das Methylglyoxal, an dessen Charakter als einer Zwischenstufe des biologischen Kohlenhydratabbaues heute wohl kaum noch gezweifelt wird, als Reaktionskomponente, so gelangt man zu der Erkenntnis, daß dieser Stoff dank seiner höheren Umsetzungsfähigkeit schnell und bei neutraler Reaktion einen Abbau der Aminosäuren

¹ *W. Traube*, B. 44, 3145, 1911.

² *A. Strecker*, Ann. 128, 363, 1862.

³ *C. J. Lintner*, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 85, 545, 1912.

⁴ *W. Ruckdeschel*, ebendasselbst 87, 430, 1914.

⁵ *N. N. Iwanoff*, diese Zeitschr. 120, 24, 1921.

⁶ *L. Grünhut* und *J. Weber*, ebendasselbst 121, 109, 1921.

⁷ *S. Kostytschew* und *W. Brillant*, H. 127, 233, 1923.

vollbringt. Es werden, wie wir bereits hervorgehoben haben, dabei neben Kohlendioxyd und Ammoniak Aldehyde bzw. Ketone gebildet. Die volle Aufklärung der Reaktion bietet besondere Schwierigkeiten, weil das entstehende Ammoniak sich mit dem vorhandenen Methylglyoxal von neuem umsetzen kann.

Bei den Purinen scheint die Reaktion über die einfache Umwandlung der Aminopurine in Oxypurine hinauszugehen.

Von dem großen Material, das wir bereits gewonnen haben, machen wir Angaben nur über die quantitativen Verhältnisse, um darzutun, daß die Umsetzung des Methylglyoxals mit den Aminokörpern einen beträchtlichen Umfang annimmt. Kurz erwähnt sei die Sonderstellung des Glykokolls. Der zu erwartende Abbau zum Formaldehyd läßt sich bei Verwendung von Methylglyoxal nicht nachweisen; wohl verschwindet letzteres und es treten auch Kohlendioxyd wie Ammoniak auf. Demnach ist ein sekundärer Verbrauch des Aldehyds in diesem Falle ganz besonders deutlich. Führt man in das System aber statt des Methylglyoxals das *Phenylglyoxal* ein, so ist die Entstehung von Formaldehyd unverkennbar.

Wir wollen diese einstweiligen Ausführungen nicht beschließen, ohne auf eine beachtenswerte Analogie aufmerksam zu machen. Die alkoholische Gärung der Aminosäuren führt, gleichfalls unter Ablösung von Ammoniak und Kohlendioxyd, zu den Alkoholen der nächst niederen Kohlenstoffreihe, und zwar ist dieser Vorgang mit dem Zerfall von Zucker gekoppelt. Nach den Befunden von O. Neubauer führt der Weg, der hierbei beschritten wird, von den Aminosäuren über Imino- bzw. Ketosäuren. Dieser Oxydation steht als reduktive Gegenleistung die Hydrierung der beim carboxylatischen Zerfall der Ketosäuren erzeugten Aldehyde gegenüber. In unserem Modellversuch unterbleibt die Hydrierung und es persistiert die Aldehydstufe, weil die korrespondierende Reduktion offenbar am Methylglyoxal oder an den Körpern ansetzt, die sekundär aus dem Brenztraubenaldehyd und den primären Spaltungsprodukten der Aminosäuren entstehen.

Auch für andere physiologische Desaminierungen kann die hier in ihren quantitativen Beziehungen dargelegte Wirkung des Methylglyoxals ein der Wahrheit vermutlich nahekommendes Modell abgeben.

Versuchstell.

I. Die Drehungsänderungen beim Zusammentreffen von Methylglyoxal mit Aminosäuren und Aminosäurenverbänden.

Die Versuchsanordnung entsprach derjenigen, die wir für die Beobachtung der Reaktion zwischen Zuckern und Aminosäuren früher gewählt und beschrieben haben¹. Die Drehungsänderungen wurden

¹ C. Neuberg und M. Kobel, diese Zeitschr. 162, 496, 1925.

so lange verfolgt, als die höchst bemerkenswerte, bei gewöhnlicher Temperatur einsetzende Huminbildung Ablesungen gestattete.

Die *Aminosäuren* waren von größter Reinheit, das *Methylglyoxal* wurde nach der ganz ausgezeichneten neuesten Vorschrift von *H. O. L. Fischer* und *C. Taube*¹ gleichfalls vollkommen rein gewonnen.

Tabelle I.

2 m l (+)-Alanin + 2 m Methylglyoxal.

Zeit	3 ccm 2 m Alanin + 3 ccm H ₂ O	3 ccm 2 m Alanin + 3 ccm 2 m Methyl- glyoxal	(l = 2 dcm)
Zu Beginn . . .	+ 0,37 ⁰	+ 0,40 ⁰	+ 0,03 ⁰
Nach 1½ Std. . .	+ 0,37	+ 0,38	+ 0,01
" 17 " . . .	+ 0,37	+ 0,33	— 0,04
" 21 " . . .	+ 0,37	+ 0,32	— 0,05
" 25 " . . .	+ 0,36	+ 0,30	— 0,06

Tabelle II.

2 m l (+)-Alanin + 3 m Methylglyoxal.

Zeit	3 ccm 2 m Alanin + 3 ccm H ₂ O	3 ccm 2 m Alanin + 3 ccm 3 m Methyl- glyoxal	(l = 2 dcm)
Zu Beginn . . .	+ 0,37 ⁰	+ 0,45 ⁰	+ 0,08 ⁰
Nach 1½ Std. . .	+ 0,37	+ 0,41	+ 0,04
" 17 " . . .	+ 0,37	+ 0,32	— 0,05
" 21 " . . .	+ 0,37	+ 0,32	— 0,05
" 25 " . . .	+ 0,36	+ 0,30	— 0,06

Tabelle III.

2 m Na-asparaginat + m Methylglyoxal.

Zeit	3 ccm 2 m Asparaginat + 3 ccm H ₂ O	3 ccm 2 m Asparaginat + 3 ccm m Methyl- glyoxal	(l = 2 dcm)
Zu Beginn . . .	— 1,34 ⁰	— 1,28 ⁰	+ 0,06 ⁰
Nach ½ Std. . .	— 1,34	— 1,29	+ 0,05
" 17 " . . .	— 1,31	— 1,42	— 0,11

Tabelle IV.

2 m Na-asparaginat + 2 m Methylglyoxal.

Zeit	3 ccm 2 m Asparaginat + 3 ccm H ₂ O	3 ccm 2 m Asparaginat + 3 ccm 2 m Methyl- glyoxal	(l = 2 dcm)
Zu Beginn . . .	— 1,34 ⁰	— 1,06 ⁰	+ 0,28 ⁰
Nach ½ Std. . .	— 1,34	— 1,07	+ 0,27
" 17 " . . .	— 1,31	— 1,55	— 0,24

¹ *H. O. L. Fischer* und *C. Taube*, B. 59, 857, 1926.

Tabelle V.

2 m Na-glutaminat + 2 m Methylglyoxal.

Zeit	3 ccm 2 m Glutaminat + 3 ccm H ₂ O	3 ccm 2 m Glutaminat + 3 ccm 2 m Methyl- glyoxal	($l = \frac{d}{2}$ dcm)
Zu Beginn . . .	— 0,80 ⁰	— 0,76 ⁰	+ 0,04 ⁰
Nach 2 $\frac{1}{2}$ Std. . .	— 0,80	— 0,77	+ 0,03
" 6 " . . .	— 0,80	— 0,78	+ 0,02

Tabelle VI.

2 m Na-glutaminat + 3 m Methylglyoxal.

Zeit	3 ccm 2 m Glutaminat + 3 ccm H ₂ O	3 ccm 2 m Glutaminat + 3 ccm 3 m Methyl- glyoxal	($l = 2$ dcm)
Zu Beginn . . .	— 0,80 ⁰	— 0,74 ⁰	+ 0,06 ⁰
Nach 2 $\frac{1}{2}$ Std. . .	— 0,80	— 0,70	+ 0,10

Tabelle VII.

20 %iges Casein-Pepton + 2 m Methylglyoxal.

Zeit	3 ccm 20 %iges Casein- Pepton + 3 ccm H ₂ O	3 ccm 20 %iges Casein- Pepton + 3 ccm 2 m Methylglyoxal	($l = 1$ dcm)
Zu Beginn . . .	— 5,41 ⁰	— 5,36 ⁰	+ 0,05 ⁰
Nach $\frac{1}{2}$ Std. . .	— 5,41	— 5,35	+ 0,06
" 16 " . . .	— 5,43	— 5,55	— 0,12
" 20 " . . .	— 5,42	— 5,57	— 0,15
" 24 " . . .	— 5,42	— 5,59	— 0,17
" 48 " . . .	— 5,41	— 5,73	— 0,32

Tabelle VIII.

20 %iges Casein-Pepton + 3 m Methylglyoxal.

Zeit	3 ccm 20 %iges Casein- Pepton + 3 ccm H ₂ O	3 ccm 20 %iges Casein- Pepton + 3 ccm 3 m Methylglyoxal	($l = 1$ dcm)
Zu Beginn . . .	— 5,41 ⁰	— 5,29 ⁰	+ 0,12 ⁰
Nach $\frac{1}{2}$ Std. . .	— 5,41	— 5,31	+ 0,10
" 16 " . . .	— 5,43	— 5,55	— 0,12
" 20 " . . .	— 5,42	— 5,57	— 0,15
" 24 " . . .	— 5,42	— 5,61	— 0,19
" 48 " . . .	— 5,41	— 5,78	— 0,37

Tabelle IX.

20 %iges Pepton e carne + 2 m Methylglyoxal.

Zeit	3 ccm 20 %iges Pepton e carne + 3 ccm H ₂ O	3 ccm 20 %iges Pepton e carne + 3 ccm 2 m Methylglyoxal	($l = 1$ dcm)
Zu Beginn . . .	— 6,22 ⁰	— 6,17 ⁰	+ 0,05 ⁰
Nach 4 Std. . .	— 6,11	— 6,09	+ 0,02
" 17 " . . .	— 6,12	— 6,21	— 0,09
" 48 " . . .	— 6,11	— 6,28	— 0,17

Tabelle X.

20%iges Pepton e carne + 3 m Methylglyoxal.

Zeit	3 ccm 20%iges Pepton e carne + 3 ccm H ₂ O	3 ccm 20%iges Pepton e carne + 3 ccm 3 m Methylglyoxal	(l = 1 dcm)
Zu Beginn . . .	— 6,22°	— 6,09°	+ 0,13°
Nach 4 Std. . .	— 6,11	— 6,00	+ 0,11
" 17 " . .	— 6,12	— 6,18	— 0,06
" 48 " . .	— 6,11	— 6,26	— 0,15

Die in den Tabellen niedergelegten Daten lehren, daß vielfach eine Umkehr des Drehungssinnes zustande kommt.

II. Die Bildung von Ammoniak, Kohlendioxyd und Aldehyden (bzw. Ketonen) aus Aminosäuren unter der Einwirkung von Methylglyoxal.

Wie im Versuchsteil I erwähnt ist, erfolgt die Umsetzung zwischen Methylglyoxal und Aminosäuren während der Aufbewahrung bei Zimmertemperatur. Um schneller einen Einblick in die quantitativen Verhältnisse zu gewinnen, haben wir die Reaktion in der Wärme angestellt und sind folgendermaßen vorgegangen:

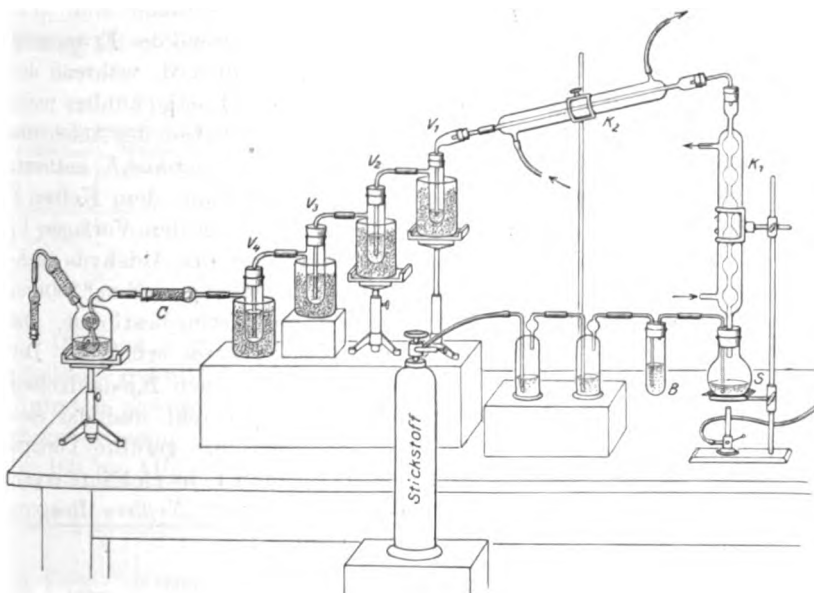


Abb. 1.

Bei Verwendung solcher Aminosäuren, die infolge Desaminierung und Oxydation flüchtige Carbonylkörper liefern, wurde zur Bestimmung

des Aldehyds (bzw. Ketons) und der Kohlensäure die durch Abb. 1 veranschaulichte Apparatur benutzt.

In dem Stehkolben *S* wurde $\frac{1}{100}$ Mol der Aminosäure in 50 bis 100 ccm Wasser gelöst (bzw. suspendiert) und in der Kälte mit der äquivalenten Menge einer wässrigen Methylglyoxallösung versetzt. Die erste der vier intensiv mit Eis gekühlten Vorlagen, *V*₁, wurde mit 10 ccm, die weiteren drei wurden mit je 30 ccm destillierten Wassers gespeist. Hinter den Adsorptionsgefäßen wurde das Chlorcalciumrohr *C* angebracht. Nun wurde zunächst während einer halben Stunde aus einer Bombe ein ziemlich kräftiger, durch Kalilauge sowie alkalische Pyrogallollösung gewaschener Stickstoffstrom durch die Apparatur gedrückt und diese so von Kohlensäure und Sauerstoff gänzlich befreit. Das unmittelbar vor dem Kolben *S* angebrachte Gefäß *B* war mit Barytwasser gefüllt; dessen dauerndes Klarbleiben zeigte die völlige Abwesenheit von CO₂ an. Während dieser Zeit der Stickstoffeinleitung entwich aus dem Reaktionsgemisch kein Kohlendioxyd. Sodann wurde die Geschwindigkeit des zugeführten Gasstromes stark verringert, jenseits des Chlorcalciumrohres der Kaliapparat angeschlossen, die Kühlung im Rückflußkühler *K*₁ angestellt und das Aminosäure-Methylglyoxal-Gemenge zum Sieden erhitzt. Das Kochen wurde so lange fortgesetzt, bis das gesamte Methylglyoxal verbraucht war. (Die Zeit wurde stets in Vorversuchen ermittelt.) Während des Erwärmens entwich aus dem Reaktionsgemisch nur Kohlendioxyd, während der gebildete Aldehyd wegen der guten Wirkung des Energiekühlers nicht oder kaum überging. Sodann wurde zwecks Abdestillation des Aldehydes der Kühler *K*₂ in Betrieb genommen und das Kühlwasser aus *K*₁ entleert. Durch Abtreiben von zwei Dritteln der Flüssigkeit aus dem Kolben *S* wurde der gesamte Aldehyd verflüchtigt; er blieb in den Vorlagen *V*₁ bis *V*₃. In *V*₄ waren nur in wenigen Fällen Spuren des Aldehyds nachzuweisen. Der Inhalt sämtlicher Vorlagen wurde vereinigt und auf 200 ccm aufgefüllt; darin wurde der Aldehyd, bzw. das Keton bestimmt. Die Kohlensäure wurde durch Wägung des Kaliapparates ermittelt. Der Rückstand des Kolbens *S* wurde quantitativ in einen Kjeldahlkolben übergeführt, mit Magnesia schwach alkalisch gemacht und das entstandene Ammoniak in eine mit n/10 Schwefelsäure gefüllte Vorlage überdestilliert. Die Rücktitration der vorgelegten Schwefelsäure ergab den genauen Ammoniakgehalt. Die Fällung mit *Neßlers* Reagens diente zum qualitativen Nachweis der Base.

l. d, l-Alanin + Methylglyoxal.

Der bei der Reaktion dieser beiden Substanzen auftretende *Acetaldehyd* wurde quantitativ durch Titration nach *Ripper-Fürth* ermittelt und qualitativ durch die Nitroprussid-Piperidin-Probe nachgewiesen.

Außerdem isolierten wir in Mengen das p-Nitro-phenylhydrazon vom Schmelzpunkt 128 bis 129°.

Die Resultate der quantitativen Feststellungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle XI.

Nr.	Alanin g	Methyl- glyoxal g	Wasser ccm	Kochdauer Std.	CH ₃ .CHO g	CO ₂ g	NH ₃ g
1	0,9	0,72	50	1 $\frac{1}{2}$	0,1990	0,0968	0,0082
2	0,9	0,72	70	1 $\frac{1}{2}$	0,2148	0,0955	0,0080
3	0,9	0,72	50	2	0,1901	0,0927	0,0060
4	1,8	0,72	50	2	0,0975	0,0970	0,0042
5	1,8	0,72	50	2	0,1039	0,0965	0,0051

2. Amino-iso-buttersäure + Methylglyoxal.

Durch Einwirkung von Methylglyoxal auf d, l-Amino-iso-buttersäure bildet sich *Aceton*. Es wurde quantitativ durch Titration mit Hydroxylaminsulfat bestimmt. Der qualitative Nachweis wurde nach anreichernder Destillation durch die *Legalsche* Probe (Nitroprussidnatrium-Natronlauge), die Nitroso-brom-propan-Reaktion und durch Fällung als p-Nitro-phenylhydrazon vom Schmelzpunkt 148° geführt.

Tabelle XII.

Amino-iso- buttersäure g	Methyl- glyoxal g	Wasser ccm	Kochdauer Std.	CH ₃ .CO.CH ₃ g	CO ₂ g	NH ₃ g
1,05	0,72	70	2	0,1253	0,0729	0,0035

3. Leucin + Methylglyoxal.

Der aus dem d, l-Leucin hervorgehende *Isovaleraldehyd* wurde möglichst quantitativ mit p-Nitro-phenylhydrazin gefällt und das Hydrazon gewogen. Der Schmelzpunkt des Isovaleraldehyd-p-nitro-phenylhydrazons lag nach Umkristallisation aus verdünntem Alkohol bei 109 bis 110°.

Tabelle XIII.

Nr.	Leucin g	Methyl- glyoxal g	Wasser ccm	Koch- dauer Std.	Iso-valer- aldehyd- p-nitro- phenyl- hydrazon g	C ₄ H ₉ .CHO g	CO ₂ g	NH ₃ g
1	1,35	0,72	70	2	0,5095	0,1992	0,1038	0,0040
2	1,35	0,72	70	2	0,4899	0,1906	0,1134	0,0042

4. Phenylaminoessigsäure + Methylglyoxal.

d, l-Phenylaminoessigsäure wird durch Methylglyoxal zu *Benzaldehyd* abgebaut. Die quantitative Bestimmung dieses Aldehyds geschah durch Wägung seines Phenylhydrazons.

Tabelle XIV.

Nr.	Phenyl- amino- essigsäure g	Methyl- glyoxal g	Wasser ccm	Koch- dauer Std.	Benz- aldehyd- phenyl- hydrazon g	C_6H_5 ·CHO g	CO ₂ g	NH ₃ g
1	1,55	0,72	120	1½	0,5286	0,2859	0,1048	0,0102
2	1,55	0,72	120	1½	0,5158	0,2790	0,1240	0,0096

5. Cystin + Methylglyoxal.

Beim Kochen von Cystin¹ mit Methylglyoxal bildete sich Acetaldehyd. Das ist nicht ohne Analogie, da dieser Aldehyd auch aus den verwandten Stoffen Serin, Isoserin und Glycerinsäure hervorgehen kann². Da gleichzeitig auch Schwefelwasserstoff auftrat und dieser sowohl in die Aldehydabsorptionsgefäße als auch in die Kalilauge überging, ist die Menge der abgespaltenen Kohlensäure nicht ermittelt. Die Titration des Acetaldehyds erfolgte nach Rektifikation über Bleicarbonat.

Tabelle XV.

Cystin g	Methylglyoxal g	Wasser ccm	Kochdauer Std.	CH ₃ · CHO g
2,4	0,72	100	2	0,0130

6. Hefensaft + Methylglyoxal.

Auch beim Kochen von Hefen-macerationssaft mit Methylglyoxal verschwand der Ketaldehyd vollkommen. Die verhältnismäßig geringen Mengen an gebildetem Aldehyd, Ammoniak und Kohlensäure lassen auf Weiterverwendung entstandener Produkte sowie präfermierten Ammoniaks schließen. Die Titration des Aldehyds nach *Ripper-Fürth* erfolgte nach einer eingeschobenen Destillation über Bleicarbonat, da sich etwas Schwefelwasserstoff in der Aldehydvorlage

¹ Um das Cystin in möglichst fein verteilter Form zu verwenden, wurde es in Natronlauge gelöst und sofort mit der genau äquivalenten Menge Schwefelsäure gefällt.

² C. Neuberg, diese Zeitschr. **67**, 59, 1914; C. Neuberg und O. Rubin, ebendasselbst **67**, 77, 1914; C. Neuberg und B. Rewald, ebendasselbst **67**, 127, 1914.

vorhand. Berechnet wurde auf Acetaldehyd, der jedenfalls unter den Reaktionsprodukten vorhanden war.

Tabelle XVI.

Nr.	Hefeneiweiß in 50 ccm H ₂ O gelöst g	Methyl- glyoxal g	Kochdauer Std.	Aldehyd g	CO ₂ g	NH ₃ g
1	3	0,72	2 $\frac{1}{2}$	0,0080	0,0394	0,0145
2	3	—	2 $\frac{1}{2}$	—	0,0006	0,0276

7. Asparaginsäure + Methylglyoxal.

Ähnlich wie die Amino-mono-carbonsäuren verhalten sich auch die Amino-di-carbonsäuren. Wegen ihrer stark sauren Natur wurden sie für diese Reaktion als *neutral reagierende* Mono-natriumsalze verwendet. Diese werden durch Methylglyoxal ebenfalls desaminiert, und unter Abspaltung von beiden CO₂-Gruppen bildet sich Aldehyd, jedenfalls aus Asparaginsäure *Acetaldehyd*. Er wurde auf die schon beschriebene Art nachgewiesen und quantitativ bestimmt.

Tabelle XVII.

Nr.	Na-aspara- ginat g	Methyl- glyoxal g	Wasser ccm	Kochdauer Std.	CH ₃ .CHO g	CO ₂ g	NH ₃ g
1	1,55	0,72	50	1 $\frac{1}{2}$	0,0306	0,0901	0,0021
2	1,55	0,72	60	1 $\frac{1}{2}$	0,0321	0,0803	0,0024
3	1,55	0,72	50	1 $\frac{1}{2}$	0,0322	0,0843	0,0020

8. Asparagin + Methylglyoxal.

In derselben Weise wie die Asparaginsäure wurde auch das Säureamid Asparagin abgebaut.

Tabelle XVIII.

Asparagin g	Methyl- glyoxal g	Wasser ccm	Kochdauer Std.	CH ₃ .CHO g	CO ₂ g	NH ₃ g
1,35	0,72	50	1 $\frac{1}{2}$	0,0120	0,0652	0,0065

9. Glutaminsäure + Methylglyoxal.

Gleich der Asparaginsäure wurde auch die Glutaminsäure als Mono-natriumsalz verwendet. Sie lieferte als flüchtiges Abbauprodukt eine aldehydische Substanz, in der Propionaldehyd, vielleicht im Gemisch mit Acetaldehyd vorlag. Die Titration wurde mit Hydroxylaminsulfat ausgeführt. Mit Nitroprussidnatrium-Piperidin trat die bekannte Farbreaktion ein.

Tabelle XIX.

Nr.	Natrium- glutaminat g	Methyl- glyoxal g	Wasser ccm	Kochdauer Std.	Aldehyd g	CO ₂ g	NH ₃ g
1	1,7	0,72	50	1 $\frac{1}{2}$	0,0145	0,0296	0,0025
2	1,7	0,72	60	1 $\frac{1}{2}$	0,0128	0,0387	0,0024
3	1,7	0,72	50	1 $\frac{1}{2}$	0,0157	0,0263	0,0029

Die sofort beim Erwärmen der Methylglyoxal-Aminosäuren-Gemische einsetzende Braunfärbung war bei Anwendung von Asparaginat und Glutaminat am stärksten.

10. Glykokoll + Methylglyoxal.

Wie schon im theoretischen Teile dieser Arbeit hervorgehoben worden ist, nimmt die Amino-essigsäure eine Sonderstellung ein, indem sie zwar gleich den vorher beschriebenen Aminosäuren mit dem Methylglyoxal reagiert, der zu erwartende Formaldehyd im Destillat aber nicht nachweisbar ist.

Tabelle XX.

Nr.	Glykokoll g	Methyl- glyoxal g	Wasser ccm	Kochdauer Std.	CH ₂ O g	CO ₂ g	NH ₃ g
1	0,75	0,72	50	1	0	0,0598	0,0060
2	0,75	0,72	60	2	0	0,0560	0,0075
3	0,75	0,72	50	4	0	0,0558	0,0075
4	1,50	0,72	60	2	0	0,0657	0,0087

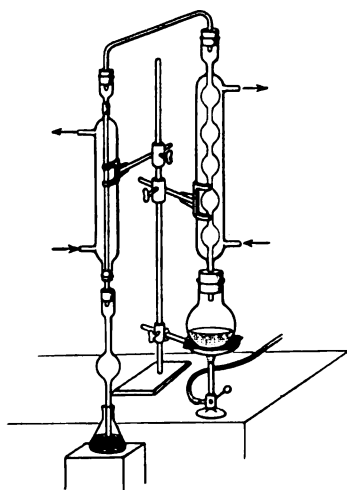


Abb. 2.

11. Lysin und Arginin + Methylglyoxal.

Die Aminosäuren, die bei dem hier beschriebenen Abbau voraussichtlich keine flüchtigen Aldehyde liefern würden, wie *Arginin* und *Lysin*, wurden nur auf ihre Ammoniakabspaltung hin untersucht. Zu diesem Zwecke wurden sie in der in Abb. 2 skizzierten Apparatur mehrere Stunden mit Methylglyoxal unter Rückfluß gekocht. (Die Einschaltung des senkrechten Energierückflußkühlers ist — ebenso wie bei der Versuchsanordnung nach Abb. 1 — nötig, um stets das Methylglyoxal zu kondensieren, bis es verbraucht ist.) NH₃ ging da-

bei nicht über, wie die Untersuchung der vorgelegten Schwefelsäure zeigte. Nach Abkühlen wurde der Kolbeninhalt mit Magnesia im Überschuß versetzt und das Ammoniak auf übliche Art in n/10 Schwefelsäure überdestilliert. Lysin wurde als neutral reagierendes Mono-chlorhydrat, Arginin als neutrales Nitrat und alkalisch reagierendes Carbonat verwendet.

Tabelle XXI.

Nr.	m/200	m/200	Wasser ccm	Kochdauer Std.	NH ₃ g
1	Lysinchlorhydrat	Methylglyoxal	60	6	0,0038
2	Arginininitrat	"	60	6	0,0170
3	"	"	60	6	0,0000
4	Arginincarbonat	Methylglyoxal	60	7	0,0270
5	"	—	60	7	0,0038

III. Desamidierung von Guanidin, Kreatin, Kreatinin, Aminopurinen und Puringlucosid durch Methylglyoxal.

Ebenso wie bei Lysin und Arginin wurde die Ammoniakbildung auch bei Guanidin, Kreatin, Kreatinin, Adenin, Guanin und Guanosin verfolgt. Guanidin wurde als Hydrochlorid und Sulfat benutzt.

Tabelle XXII.

Nr.	m/200	Methyl- glyoxal g	Wasser ccm	Kochdauer Std.	NH ₃ mg
1	Guanidinhydrochlorid	0,36	50	6	1,5
2	Guanidinsulfat	0,36	50	6	1,5
3	Kreatin	0,36	50	7	2,6
4	Kreatinin	0,36	50	7	2,9
5	Adenin	0,36	60	5	1,8
6	"	—	60	5	0
7	Guanin ¹	0,36	100	5	3,0
8	"	—	100	5	0
9	Guanosin ²	0,36	100	5	1,8
10	"	—	100	5	0,2

IV. Bildung von Ammoniak, Kohlendioxyd und Aldehyden beim Zusammentreffen von Phenylglyoxal und Aminosäuren.

1. d,l-Alanin + Phenylglyoxal.

Phenylglyoxal führt den gleichen Abbau des Alanins wie das Methylglyoxal herbei. Es entstehen reichlich NH₃, CO₂ sowie Acetaldehyd.

¹ Das Guanin ging beim Kochen mit Methylglyoxal in Lösung.

² Dargestellt nach P. A. Levene und W. A. Jacobs, Ber. 48, 3145, 1910.

Tabelle XXIII.

Nr.	Alanin g	Phenyl- glyoxalhydrat g	Wasser ccm	Kochdauer Std.	CH ₃ .CHO g	CO ₂ g	NH ₃ g
1	0,9	1,52	70	1 1/2	0,1335	0,1185	0,0015
2	0,9	1,52	70	2	0,1364	0,1122	0,0021

2. Glykokoll + Phenylglyoxal.

Das Gemisch von Glykokoll und Phenylglyoxal unterscheidet sich insofern von dem System Glykokoll-Methylglyoxal, als hier *Formaldehyd* in das Destillat überging. Dieses färbte das Fuchsin-schweflig-säure-Schwefelsäure-Reagens blaviolett. Der charakteristische, in saurer Lösung beständige Farbenton gestattete auch die quantitative kolorimetrische Bestimmung des Formaldehyds. Die nach dieser Methode erzielten Werte stimmten mit den durch Sulfittitrationen erhaltenen vollkommen überein.

Tabelle XXIV.

Nr.	Glykokoll g	Phenyl- glyoxalhydrat g	Wasser ccm	Zeitdauer Std.	CH ₂ O g	CO ₂ g	NH ₃ g
1	0,75	1,52	80	3	0,0264	0,1122	0,0097
2	0,75	1,52	80	3	0,0314	0,1092	0,0093

Weiteres über Abfangverfahren.

Von

Carl Neuberg und Maria Kobel.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Von den *Abfangverfahren*, die einen Eingriff in die Vorgänge beim biologischen Abbau der Kohlenhydrate ermöglichen, hat die *Sulfitmethode*, seitdem sie im Jahre 1916 beschrieben worden ist¹, bisher die weitgehendste Nutzung gefunden. Sie befriedigt zugleich insofern am meisten, als bei ihrer Anwendung auf die alkoholische Gärung der Hefe und anderer Mikroorganismen die Korrelation der Erscheinungen — Fixation einer Oxydationsstufe, erzwungene Anhäufung einer Reduktionsstufe — voll geklärt ist. Die *Eignung als Abfangmittel*² ist auch für zugefügten Acetaldehyd, der durch die eigenartige *carboligatische Synthese* Acetaldehyd bindet, wenn er bei der Spaltung von Zucker im status nascens auftritt, festgestellt und bilanzmäßig³ hinreichend ergründet. Das *Dimedonverfahren*, nach dem man auf ähnliche Weise wie durch die sekundären schwefligsauren Salze das Intermediärgelbte Acetaldehyd zu fesseln imstande ist, leistet in quantitativer Hinsicht allem Anscheine nach weniger. Bei der Beschreibung dieses Verfahrens haben C. Neuberg und E. Reinfurth⁴ noch eine Reihe weiterer Prinzipien zur Abfangung vorgeschlagen, darunter die Heranziehung der wenig giftigen *Säurehydrazide*. Gestützt auf lange zurückliegende Erfahrungen⁵ über das rein chemische Verhalten des *Thiocarbaminsäure-hydrazids* (Thiosemicarbazids) zu aliphatischen Körpern haben wir Versuche mit diesem Mittel vorgenommen; denn es ist verhältnismäßig ungiftig und reagiert, wie wir

¹ C. Neuberg und E. Färber, diese Zeitschr. 78, 238, 1916; C. Neuberg und E. Reinfurth, ebendasselbst 89, 365, 1918; 92, 234, 1918.

² C. Neuberg und E. Reinfurth, ebendasselbst 148, 557, 1923; C. Neuberg und E. Simon, ebendasselbst 156, 378, 1925.

³ L. Elion, ebendasselbst 169, 471, 1926.

⁴ C. Neuberg und E. Reinfurth, ebendasselbst 106, 286, 1920.

⁵ C. Neuberg und W. Neimann, B. 35, 2049, 1902.

früher beschrieben haben, mit dem für biologische Zwecke als Ausgangsmaterial dienenden Zucker nur mäßig schnell.

Die Ergebnisse, die wir erzielt haben, sind kurz folgende:

Es kann mit Leichtigkeit *Acetaldehyd* abgefangen werden, und zwar in einer Ausbeute von rund 9 % der Theorie. Ein Teil des benutzten Hydrazids setzt sich mit dem verwendeten Traubenzucker um; außerdem scheinen — aber keineswegs regelmäßig — andere Verbindungen zu entstehen. Das Thiosemicarbazon der Brenztraubensäure haben wir bisher nicht nachgewiesen; gelegentlich hat sich das Bis-thiocarbaminsäure-hydrazon des Methylglyoxals isolieren lassen. Allein es ist dieses bisher keineswegs regelmäßig gelungen, so daß die Möglichkeit einer Entstehung des Methylglyoxals durch den Stoffwechsel fremder Erreger nicht ausgeschlossen ist. Seine Bildung durch andere Zellarten als durch Hefe haben früher *A. Fernbach*¹, *E. Aubel*² sowie *E. Toenniessen* und *W. Fischer*³ angegeben. Wir teilen unsere Erfahrungen deshalb mit, weil soeben *S. Kostytschew* und *S. Soldatenkov*⁴ beschrieben haben, daß unter dem Einfluß des unserem Thiocarbaminsäurehydrazid nahestehenden Semicarbazids allem Anschein nach regelmäßig Methylglyoxal bei der Hefengärung und außerdem Brenztraubensäure bei der Milchsäuregärung abgefangen werden kann. Von der bei unserem Vorgehen jedenfalls sicheren Fixierung des Acetaldehyds berichten die Autoren nichts. Wir können aber mit Bestimmtheit erklären, daß auch mittels Semicarbazid Acetaldehyd bei der alkoholischen Zuckerspaltung abgefangen wird. Wir möchten auf Grund unserer bisherigen Ergebnisse nur behaupten, daß das Thiocarbaminsäurehydrazid, wie vorauszusehen war, ein Abfangmittel für Acetaldehyd ist, und wir geben unsere Feststellungen bekannt, um ungestört die angekündigte Durchführung des Programms vornehmen zu können, das wir in der erwähnten Mitteilung aus dem Jahre 1920 klar entwickelt hatten.

Auszüge aus den Protokollen.

1. In einer Lösung von 100 g Glucose in 1500 ccm Wasser wurden 50 g frische Unterhefe Patzenhofer suspendiert; nach Angärung wurde eine Lösung von 10 g Thiocarbaminsäurehydrazid in 500 ccm Wasser tropfenweise hinzugefügt. Die Gärung wurde dadurch nicht unterbrochen; es erfolgte eine äußerst minimale, den Vorgang nicht störende Schwefelwasserstoffentwicklung. Nach 24 stündiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wurden 250 ccm des 2100 ccm betragenden

¹ *A. Fernbach*, C. r. 151, 1004, 1910.

² *E. Aubel*, Thèse de Paris 1921.

³ *E. Toenniessen* und *W. Fischer*, H. 161, 254, 1926.

⁴ *S. Kostytschew* und *S. Soldatenkov*, H. 168, 124 und 128, 1927.

Gärgutes mit 2,5 g Phthalsäureanhydrid nach der früher für diese Zwecke empfohlenen Methode¹ eine Stunde bei intensiver Kühlung unter Rückfluß gekocht und nach dem Erkalten sowie Durchspülen des Kühlers nunmehr mit Wasserdampf in der für Aldehyd üblichen Weise destilliert. Dabei gingen reichliche Mengen Acetaldehyd über. Die Destillation wurde so lange fortgesetzt, bis eine gesondert aufgefangene Probe keine *Riminische* Reaktion (Blaufärbung mit Nitroprussidnatrium plus Piperidin) mehr gab. Dann wurde auf 1000 ccm aufgefüllt und der Acetaldehyd nach der Methode von *Ripper-Fürth* quantitativ bestimmt.

In 250 ccm Gärgemisch wurden so 0,2704 g Acetaldehyd ermittelt. Es errechnet sich demnach für den ganzen Ansatz der Gehalt an diesem Aldehyd zu 2,272 g. Da 100 g Traubenzucker 24,44 g Acetaldehyd entsprechen, beläuft sich die erzielte Ausbeute auf 9 % der Theorie.

Der zur Titration nicht benutzte Anteil des Destillats wurde anreichernd destilliert und der Acetaldehyd als p-Nitro-phenylhydrazon gefällt. Nach dem Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol besaß die Verbindung den richtigen Schmelzpunkt von 128°.

Der nach Abnahme der 250 ccm verbliebene Rest des Gärgemisches wurde filtriert und die klare Flüssigkeit im *Faust-Heimschen* Verdunstungskasten so weit eingengt, bis der gesamte Rückstand zu einem Kristallbrei erstarrte. Dieser wurde abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und aus Wasser umkristallisiert. Die beim Abkühlen zuerst ausgefallene Fraktion (1,1 g) wies einen Schmelzpunkt von 141° auf, der durch eine zweite Umkristallisation der Substanz aus Wasser auf 146° stieg. Dieser Schmelzpunkt sowie auch die Analyse der im Hochvakuum getrockneten Substanz zeigten, daß das Thiosemicarbazon des Acetaldehyds² vorlag.

0,0718 g Substanz gaben bei 24° und 754 mm 22,8 ccm N₂.

C₃H₇N₃S. Ber.: N = 35,9 %; gef.: N = 36,2 %.

Die leichter löslichen Kristallfraktionen enthielten die Thiosemicarbazone von Acetaldehyd wie von Glucose. Die letzte Fraktion drehte das polarisierte Licht stark nach links; nach der Analyse war ziemlich reines Glucose-thiosemicarbazon³ vorhanden.

2. Eine Wiederholung des angeführten Versuchs bei 38° hatte das gleiche Ergebnis. Es wurden durch die Spaltung mit Phthalsäureanhydrid 2,243 g Acetaldehyd aus 100 g Glucose erhalten, auch wurde das Thiosemicarbazon dieses Aldehyds in Substanz isoliert.

¹ C. Neuberg und W. Neimann, l. c.

² M. Freund und A. Schander, B. 35, 2602, 1902.

³ C. Neuberg und W. Neimann, B. 35, 2055, 1902.

3. Der gleiche Versuch mit frischer Oberhefe Sinner, bei 24° an-
gestellt, lieferte auf 100 g Glucose 1,279 g Acetaldehyd.

Die folgenden Versuche lehren, daß größere Mengen Thiocarbamin-
säurehydrazid und Hefe die Ausbeuten an Acetaldehyd nur wenig
beeinflußten.

4. Ein Ansatz, der bei Zimmertemperatur belassen wurde, enthielt
in 1050 ccm 50 g Glucose, 25 g Unterhefe Patzenhofer sowie 10 g Thio-
carbaminsäurehydrazid, das nach Beginn der Gärung als 2 %ige Lösung
zutropft wurde. Gewonnen wurden 1,023 g Acetaldehyd oder für
100 g Glucose 2,046 g Aldehyd.

5. 50 g Glucose,
25 g Unterhefe Patzenhofer,
25 g Thiocarbaminsäurehydrazid.
Gesamtvol. 1700 ccm; Temperatur 24°.

Gef. für 50 g Glucose 0,9898 g Acetaldehyd;
also „ 100 g „ 1,9796 g „ .

6. 3,6 g Glucose,
4 g Unterhefe Patzenhofer,
3,6 g Thiocarbaminsäurehydrazid¹.
Gesamtvol. 290 ccm; Temperatur 24°.

Gef. für 3,6 g Glucose 0,067 g Acetaldehyd;
daraus berechnet sich
für 100 g Glucose 1,861 g Acetaldehyd.

7. 3,6 g Glucose,
12 g Unterhefe Patzenhofer,
3,6 g Thiocarbaminsäurehydrazid.
Gesamtvol. 300 ccm; Temperatur 24°.

Gef. für 3,6 g Glucose 0,059 g Acetaldehyd;
ber. „ 100 g „ 1,640 g „ .

8. 3,6 g Glucose,
4 g Unterhefe Patzenhofer,
7,2 g Thiocarbaminsäurehydrazid.
Gesamtvol. 380 ccm; Temperatur 24°.

Gef. für 3,6 g Glucose 0,062 g Acetaldehyd;
ber. „ 100 g „ 1,722 g „ .

¹ In diesem Versuch wurde eine 2 %ige Thiocarbaminsäurehydrazid-
lösung unmittelbar nach erfolgter Angärung auf einmal zugegossen; in
allen anderen Ansätzen ließen wir sie tropfenweise zufließen.

9. 3,6 g Glucose,
12 g Unterhefe Patzenhofer,
3,6 g Thiocarbaminsäurehydrazid.
Gesamtvol. 300 ccm; Temperatur 38°.

Gef. für 3,6 g Glucose 0,090 g Acetaldehyd;
ber. „ 100 g „ 2,500 g „ „

Das Methylglyoxal-bis-thiosemicarbazon, das gleich dem früher (l. c.) von uns beschriebenen Derivat des einfachen Glyoxals in Wasser vollkommen unlöslich ist, müßte sich während des desmolytischen Zuckerzerfalls abscheiden und im Filtrationsrückstande auffindbar sein. In allen den bisher angeführten Versuchen gelang dieser Nachweis nicht; dagegen konnte das Methylglyoxalderivat aus folgendem Ansatz isoliert werden.

10. 3,6 g Glucose in 20%iger Lösung wurden mit 4 g Unterhefe Patzenhofer bei 38° zur Angärung gebracht; dazu setzten wir tropfenweise 7,2 g Thiocarbaminsäurehydrazid in 360 ccm Wasser. Temperatur 38°. Nach 20 Stunden war die Ausscheidung eines hellgrauen Niederschlags an den Gefäßwandungen und über der Hefe deutlich zu beobachten. Nach 48 Stunden war die Gärung beendet. Zur Aufarbeitung wurde warm filtriert, mit heißem Wasser nachgewaschen und aus dem Filtrat Acetaldehyd auf die angegebene Weise durch Spaltung mit Phthalsäureanhydrid gewonnen.

Ausbeute 0,072 g Acetaldehyd aus 3,6 g Glucose; für 100 g Hexose errechnen sich also 2,0 g Acetaldehyd.

Der feste Rückstand, der neben dem Hefenmaterial das unlösliche Di-thiosemicarbazon des Methylglyoxals einschloß, wurde in etwa 100 ccm absoluten Alkohols suspendiert und mit 5 ccm 8%iger Natronlauge $\frac{1}{2}$ Stunde geschüttelt. Das Thiosemicarbazon ging als Na-Salz in Lösung und färbte das Gemisch gelbbraun. Wir filtrierten, wuschen den Rückstand mit Alkohol nach und säuerten das Filtrat schwach mit Essigsäure an. Sofort schied sich ein körniger hellgelber Niederschlag aus. Derselbe wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen, dann zur Reinigung nochmals in 98%igem Alkohol suspendiert und mit 5 ccm 8%iger Natronlauge kurz geschüttelt. Von geringen Mengen ungelöster Substanz wurde abfiltriert und das Methylglyoxalderivat erneut mit Essigsäure ausgefällt. Ausbeute 0,7 g Thiosemicarbazon.

Der Schmelzpunkt des Methylglyoxal-bis-thiosemicarbazons lag bei 257° und stimmte vollkommen mit dem eines synthetisch bereiteten Präparats überein.

0,0599 g Substanz gaben bei 22° und 754 mm 20,4 ccm N₂.

C₅H₁₀N₆S₂. Ber.: N = 38,6%; gef.: N = 38,3%.

Bei einer Wiederholung des Versuchs ließ sich wohl praktisch die gleiche Menge Acetaldehyd nachweisen, die Methylglyoxalverbindung konnte aber nicht mehr isoliert werden.

11. Ein dem Versuch 1 (s. S. 212) vollkommen entsprechender Ansatz, zu dem eine dem Thiocarbaminsäurehydrazid äquivalente Menge Semicarbazid in Form einer mit Soda neutralisierten Lösung des Chlorhydrats als Abfangmittel benutzt wurde, lieferte bei gleichartiger Verarbeitung (Abdestillation des Acetaldehyds nach Spaltung seines in Lösung befindlichen Semicarbazons mittels Phthalsäureanhydrid) 1,340 g Acetaldehyd aus 100 g Glucose. —

Bei Fortsetzung der Versuche wird man vielleicht weiter kommen, wenn man als Ausgangsmaterial nicht einen das Hydrazinderivat bindenden Zucker mit „freiem Carbonyl“ verwendet, sondern ein Di- oder Polysaccharid, das erst allmählich durch Agenzien der Hefe selber hydrolysiert wird.

Übertritt von Methylalkohol in den Tabakrauch.

Von

Carl Neuberg und Berta Ottenstein.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Zu den Bestandteilen des Tabaks, die in chemischer wie pharmakologischer Hinsicht ein besonderes Interesse bieten, ist durch die Untersuchungen von *C. Neuberg* und *M. Kobel*¹ der *Methylalkohol* getreten. Die Genannten haben vor einiger Zeit gezeigt, daß dieser bisher übersehene Stoff regelmäßig und in charakteristischer Weise im Tabakblatt und auch in den Tabakerzeugnissen vorkommt. Eine Muttersubstanz des Methylalkohols ist das Pektin, und dieses ist dadurch gekennzeichnet, daß es den Methyl ester einer komplexen Kohlenhydratsäure² darstellt; der Gehalt der Pektinsorten an Methylalkohol soll bis 11 % betragen.

Beachtung verdient die von *Neuberg* und *Kobel* festgestellte Tatsache, daß der in esterförmiger Bindung vorhandene Methylalkohol des Tabaks während der Umwandlung des frischen Blattes in das rauchfähige Tabakgut abnimmt. Bekanntlich unterliegt der gepflückte Tabak einem als Fermentation bezeichneten Reifungsprozeß. Nach vorangegangener Trocknung vollziehen sich in den gestapelten Tabakblättern Umsetzungen, die wahrscheinlich dreierlei Ursachen haben. Neben rein chemischen Prozessen kommen biochemische Zustände, die durch die eigenen Enzyme des Tabakblattes hervorgerufen werden, sowie weiterhin Umformungen, welche durch Mikroorganismen herbeigeführt werden. Wir wollen zunächst keinen Unterschied zwischen diesen drei Vorgängen machen. Als genügende Grundlage diene uns der Befund von *Neuberg* und *Kobel*, daß bei der Tabakgärung eine Verminderung des im Pektin als Ester vorhandenen Methylalkohols stattfindet. In bezug hierauf verhalten sich die diversen Tabak-

¹ *C. Neuberg* und *M. Kobel*, diese Zeitschr. **179**, 459, 1926; *Naturwissenschaften* **14**, 1182, 1926.

² *Th. v. Fellenberg*, diese Zeitschr. **85**, 118, 1918; *F. Ehrlich* und *R. v. Sommerfeld*, ebendasselbst **168**, 263, 1926; *F. Ehrlich* und *F. Schubert*, ebendasselbst **169**, 13, 1926.

erzeugnisse ungleich; während ursprünglich der Pektingehalt als angenähert gleich angesehen werden kann, sinkt der Gehalt an esterförmig gebundenem Methylalkohol während der Fermentation bei Zigarrentabaken von $9\frac{0}{100}$ auf durchschnittlich $1\frac{0}{100}$, bei Zigaretten auf durchschnittlich 5 bis $7\frac{0}{100}$. Diese Verschiedenheiten beruhen auf der abweichenden Art der Vorbehandlung, der Zigarrentabak und Zigaretten-tabak unterworfen werden. Wir können hinzufügen, daß der zum *Rauchen in der Pfeife bestimmte Tabak* im gebrauchsfähigen Zustande Ungleichheiten aufweist, je nachdem er mehr dem Zigaretten- oder dem Zigarrentabak ähnelt. Die fertigen Pfeifentabake stellen vielfach Gemische verschiedener Sorten dar, so daß ihr Verhalten auch aus diesem Grunde erklärlich ist. Wir haben z. B. im Tabak Shenandoah (Mixture), feinsten aromatischer Krull, Thorbeck & Co., Mannheim, $2,20\frac{0}{100}$ und im Tabak Navycut (Lotzbeck) $4,55\frac{0}{100}$ estermäßig gebundenen Methylalkohols nachgewiesen.

Da ersichtlicherweise in Abhängigkeit von der Zubereitung ein mehr oder minder großer Teil des leicht abspaltbaren Methylalkohols in den Tabakfabrikaten verbleibt, so erhob sich die Frage, was wird aus diesem Methylalkohol beim Verrauchen? Von vornherein hätte man erwarten können, daß im Glimmprozeß der Methylalkohol vollkommen verbrennen, allenfalls bei unzureichender Luftzufuhr Formaldehyd oder Kohlenoxyd liefern würde.

Überraschenderweise liegen die Verhältnisse aber anders; denn wir haben gefunden, daß *erhebliche Mengen Methylalkohol in den Tabakrauch übertreten und mit eingeatmet werden*, während wir Formaldehyd nicht mehr als in minimalsten Spuren haben beobachten können.

Die Beurteilung der ganzen Vorgänge wird nun dadurch erschwert, daß Methylgruppen im Tabak nicht allein in Gestalt von Pektin-ester vorhanden sind, sondern auch in Ätherform. Die Menge des (im Lignin) ätherartig gebundenen Methoxyls ist in fertigen Zigarrentabaken, die erwähnensmaßen arm an esterförmigem Methylalkohol sind, relativ hoch. Sie erreicht den vier- bis siebenfachen Betrag des in ihnen in Esterform enthaltenen Methoxyls. Bei den Zigarettentabaken, die reich an Methylester sind, ist der Methyläthergehalt vergleichsweise geringer. Außer diesen beiden Bindungsformen findet sich eine Methylgruppe im Nikotin und wahrscheinlich auch in dessen Nebenalkaloiden vor. Sieht man von den Möglichkeiten anderer Herkunft für das Methanol ab, so kommen jene erwähnten drei Quellen für den im Rauch anwesenden Methylalkohol in Betracht.

Die Tatsache, daß der Methylalkoholgehalt des *Zigarettenrauches* in allen Fällen der größere war, wies darauf hin, daß Pektin-ester die Hauptlieferanten sind. Eine Stütze für diese Anschauung gewannen wir durch vergleichende Rauchversuche an Zigaretten- und Zigarren-

tabaken, die vorher von Pektin befreit waren. Zur Entfernung des Pektins gingen wir so vor, daß wir den Angaben der Literatur gemäß das Tabakmaterial bei 100° erschöpfend mit Wasser auszogen. Die Extraktionen wurden so lange fortgesetzt, als noch eine die Naphthoresorcin-probe liefernde Substanz in Lösung ging, also bis alles erfaßbare Pektin und dessen Spaltungsprodukte beseitigt waren. Der dann hinterbliebene Rückstand enthielt tatsächlich nur noch Spuren durch alkalische Verseifung frei werdenden esterförmigen Methylalkohols, dagegen erhebliche Mengen Methoxyl in Ätherbindung. Der Rauchversuch mit diesem Rückstand ergab, daß in die Dämpfe jetzt nur recht geringe Mengen Holzgeist gelangen.

Diese Untersuchungen sind an einem Zigaretten tabak sowie zwei deutschen Tabaken, und zwar *Seckenheimer* sowie *Dudenstädter Tabak* ausgeführt, die wir der Güte des Herrn *Hermann Ritter* von der Firma *Martin Brinkmann* in Bremen verdanken.

Weiterhin ist es durch die Extraktionsversuche (s. S. 224) wahrscheinlich geworden, daß nicht allein zur Pektingruppe gehörige Methyl-ester bei der Extraktion in Lösung gehen, sondern auch andere Methylalkohol liefernde Bestandteile. Möglicherweise wird beim Fermentationsprozeß ein Teil unlöslichen Lignins in lösliche Derivate verwandelt; doch muß dieses Problem an einem größeren Material eingehender studiert werden.

Durch Extraktion mit Weingeist kann man den an die Basen geknüpften Methylrest, also im wesentlichen die Salze des Nikotins und seiner Verwandten, entfernen. Der mit Äthylalkohol behandelte und wieder getrocknete Tabak enthält noch reichlich äther- wie ester-mäßig gebundenes Methoxyl; die Verrauchung dieses Materials gab einen holzgeistreichen Tabakqualm. Bei der Extraktion mit Äthylalkohol hatte der verwendete Tabak 13,6 % an „Gesamt-methylalkohol“ und 8,4 % an „Pektin-methylalkohol“ verloren. Die extrahierte Menge Methanol liefernder Substanz fand sich fast vollkommen im Abdampfückstand des Äthylalkohols. Im Rauchversuch wurde jedoch nur etwas mehr als die Hälfte der Holzgeistmenge ermittelt, die der unbehandelte Tabak geliefert hat. Wir glauben, daß der mit Äthylalkohol ausgelaugte Tabak nicht mehr die natürliche Glimmfähigkeit besitzt, worauf auch das Verhalten im Rauchversuch deutlich hinwies.

Soweit die bisherigen Versuche einen Schluß zulassen, so kann man sagen, daß der überraschenderweise im Tabakrauch gefundene Methylalkohol in erster Linie dem als Ester vorhandenen und darin verhältnismäßig locker haftenden Methylalkohol entstammt. Daneben trägt auch das im Lignin ätherförmig vorhandene Methoxyl zu einer Anreicherung des Tabakrauches an Holzgeist bei, während die mit

Weingeist extrahierbaren, am Stickstoff methylierten Tabakbasen wohl nur in beschränktem Umfange als Methanol-lieferanten anzusprechen sind.

Die Ergebnisse bezüglich des Methylalkoholgehalts von Tabakrauch sind teils durch künstliche, teils durch natürliche Rauchversuche erzielt. Zur Nachahmung des Rauchaktes hat vor Jahren *J. Habermann*¹ einen Apparat angegeben, der ein intermittierendes Rauchen ermöglicht. Da der Methylalkohol zu den sehr flüchtigen Bestandteilen gehört, mußten an der verwendeten Apparatur Veränderungen vorgenommen werden; dem genannten Forscher ist es nicht gelungen, alle flüchtigen Produkte, die beim Rauchakt auftreten, in einfacher Weise zu verdichten. Wir haben uns davon überzeugt, daß dies mit seiner Versuchsanordnung tatsächlich kaum möglich ist. Ganz leicht gelingt aber die Lösung des Problems, wenn man sich zur Kondensation der flüchtigen Bestandteile der flüssigen Luft bedient. Die ausgestoßenen Rauchgase werden durch zwei Péligröttröhen getrieben, die in ein Dewargefäß tauchen; in ihnen kondensiert sich restlos die Gesamtheit der Rauchprodukte². Zur Sicherheit wurde noch ein drittes Gefäß, das mit Wasser gefüllt und von außen mit Eis gekühlt war, an die zweite Péligröttröhre angeschlossen. Durch dieses trat auch keine Spur dampfförmiger Stoffe mehr aus.

In der Apparatur können an Glasmundstücken sowohl Zigarren als Zigaretten wie durch Einfügung eines Gummistopfens ebenfalls Porzellanpeifen geraucht werden. Man vermag das Tempo des intermittierenden Rauchens so einzustellen, wie es ein Raucher in der Norm innehält.

In allen Fällen wird der Inhalt der Vorlagen nach Beendigung des Versuchs mit Wasser in einen Meßkolben übergespült und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Die infolge Gegenwart brenzlich-ölartiger Produkte trübten Flüssigkeiten wurden unter Zusatz einiger Tropfen Schwefelsäure, gegebenenfalls unter Zufügung von ein wenig Tierkohle, einmal destilliert. Das dann erhaltene, schon nahezu farblose Destillat wurde unter Vermeidung von Verlusten anreichernd einkonzentriert und schließlich eine Lösung gewonnen, in welcher der Methylalkohol nach der Methode von *Th. v. Fellenberg*³ quantitativ bestimmt wurde.

In den Fällen, in denen die Versuchsperson selbst rauchte, gingen wir folgendermaßen vor:

Nach Verschuß der Nase mit der bei Atmungsversuchen gewöhnlich benutzten Nasenklemme wurde in üblicher Weise geraucht und der

¹ *J. Habermann*, H. 33, 71, 1901.

² Vgl. die Apparatur von *G. Gorr* und *G. Perlmann*, diese Zeitschr. 174, 430, 1926.

³ *Th. v. Fellenberg*, ebendasselbst 85, 69, 1918.

inspirierte Rauch durch ein eng anschließendes Gummimundstück exhalirt. Dieser Kautschukteil war mit dem vorhin erwähnten System von Absorptionsgefäßen durch eine gläserne Leitung verbunden. Obgleich aus leicht erklärlichen Gründen, nämlich wegen Zurückbleibens eines sehr erheblichen Teiles des Tabakrauches im Mundspeichel, der Methylalkoholgehalt fast auf Null herabsinkt, so genügen doch beim Durchtreiben der exhalirten tabakqualmhaltigen Atemluft als Vorlagen eisgekühlte Gaswaschflaschen nicht, selbst wenn zur stärkeren Fixation vorhandener Holzgeistspuren noch ein Chlorcalciumrohr eingeschaltet wird. (Chlorcalcium bildet mit Methanoleine relativ beständige Doppelverbindung.) Die Kondensation mit flüssiger Luft ist auch hier unerläßlich.

Dabei hat sich nun ergeben, daß höchstens der zehnte Teil des ursprünglich im Tabakrauch vorhandenen Methylalkohols mit der Atemluft den Körper verläßt. Die bei weitem größte Menge löst sich offenbar wegen der bedeutenden Hydrophilie des Holzgeistes im Speichel; er wird also in Form einer wässerigen Methylalkohollösung zurückgehalten. Eine Betrachtung der in den Péligröttröhen angesammelten, durch flüssige Luft verdichteten Rauchprodukte vermittelt eine Vorstellung davon, welch eine gewaltige Quantität von Produkten der Destillation bzw. der Verglimmung in den Organismus gelangt. Der Rauchakt gestaltet sich nicht ganz unähnlich dem Vorgange der technischen Gewinnung von Methylalkohol durch Verkohlung von Holz und Blättern. Man begreift zugleich, daß die im genußfreudigen Orient verbreitete Nargileh, die Wasserpfeife, weiser Erkenntnis ihre Beliebtheit verdankt; beim Durchsaugen des Tabakqualms durch ein Wasserreservoir werden sicherlich viele schädliche Bestandteile entfernt.

Bisher hat man in bezug auf die pharmakologischen Wirkungen den wesentlichen Wert auf den Gehalt des Tabakdampfes an Nikotin gelegt. Es erhebt sich nun die Frage, ob die durch den Rauchakt aufgenommene Quantität Methylalkohol eine pharmakologisch ausgeprägte Wirkung entfaltet. Eine Vorstellung über die zugeführte Menge Holzgeist vermittelt folgende Überschlagsrechnung. Ein Raucher, der am Tage zehn Zigarren mittleren Umfanges konsumiert, verraucht rund 70 g Tabak und atmet etwa 42 mg Methylalkohol ein. Ein Raucher, der 20 Zigaretten, etwa eine Menge von 20 g Tabak raucht, inhaliert 40 mg, also ungefähr dasselbe Quantum. An sich wäre nach allen vorliegenden Angaben der Literatur¹ diese Menge Holzgeist bei einmaliger Gabe nicht giftig. Wie sich aber die Dinge bei einer jahrzehntelangen Einverleibung gestalten, kann nicht a priori beantwortet werden.

¹ Siehe bei *M. Kochmann*, Handb. d. exper. Pharm. I. 381, 1923; *S. Bodjors*, Chem. Centralbl. 1924, I, 574; *G. Reif*, ebendaselbst 1926, II, 801; *C. Egg*, Schweizer med. Wochenschr. 57, 5, 1927.

Da von Autoren, die sich mit der Methylalkoholfrage beschäftigt haben, hervorgehoben wird, daß eine kumulative Wirkung existiert, so wird man mit einer solchen rechnen müssen. Ferner ist in Betracht zu ziehen, daß der Methylalkoholdampf im Verein mit den übrigen Giften des Tabakrauches anders wirken kann als für sich; denn erfahrungsgemäß verhalten sich Kombinationen von Giften oft anders als die einzelnen Bestandteile.

Experimentelles.

A. Bestimmung von locker und fest gebundenem Methylalkohol in verschiedenen Tabakpräparaten.

a) Der *locker gebundene Methylalkohol* wurde durch Verseifung der entrippten und fein gemahlenen Tabakblätter mit Natronlauge in Freiheit gesetzt; auf 100 g Tabak kamen 300 ccm 10%ige Natronlauge. Dabei gingen wir ebenso vor, wie *Neuberg* und *Kobel* (l. c.), und konzentrierten das entsprechend gereinigte Destillat durch anreichernde Destillationen. Die Untersuchung der schließlich erhaltenen Methylalkohol-lösung geschah bei denjenigen Tabaksorten, von denen uns eine größere Menge zur Verfügung stand, nach drei Methoden:

1. durch Ermittlung des spezifischen Gewichts,
2. nach der Methode von *Zeisel* (Methoxylbestimmung),
3. nach der kolorimetrischen Methode *Th. v. Fellenbergs*.

Tabelle I gibt einen Überblick über die Ergebnisse der quantitativen Analysen.

Tabelle I.

Nr.	Tabaksorten bzw. fertige Zigarren	Gehalt an Trockensubstanz in %	‰ estermäßig gebundener Methylalkohol berechnet auf Trockensubstanz		
			nach pykn. Bestimm.	nach Methoxylbest.	n. kolorim. Bestimm.
1	Dudenstädt Eichsfeld	89,07	4,05	3,85	3,83
1a	(Ritter)	88,93	3,95	3,96	4,21
2	Seckenheimer	86,44	2,89	2,83	2,70
2a	(Ritter)	86,44	2,78	2,58	2,53
3	Marienwerder	91,69	3,05	3,01	2,80
3a	(Ritter)	91,62	2,95	2,84	2,86
4	Shenandoah (Mixture)	90,54	2,44	2,24	2,39
4a	Thorbeck & Co., Mannheim	90,65	2,44	2,17	2,05
5	Navycut (Lotzbeck)	88,71	5,01	—	4,51
5a		88,78	4,84	4,65	4,61
6	Zigarettentabak Garbaty	89,59	3,23	3,72	3,49
6a	Marke A	89,59	3,30	—	3,48
7	Zigarren Marke	95,14	1,02	—	0,78
7a	Welthandel	95,14	0,99	—	0,75
	Havana Companie				
8	Holländer Zigarre Marke	93,94	0,51	—	0,51
8a	Joaquin Barrera	93,94	0,51	—	0,54

b) Zur Bestimmung des *fest gebundenen Methylalkohols* wurden, je nach dem zu erwartenden Methoxylgehalt, 1 bis 2 g feingemahlener Tabaksubstanz mit 30 bis 60 ccm (auf 1 g 30 ccm) 72 Vol.-% H_2SO_4 in einem Schliffkolben übergossen und dieser sofort mit einem senkrechten Energie-kühler verbunden. Das Gemenge wird zunächst 10 Minuten lang im Sieden belassen, dann abgekühlt, und schließlich werden 50 bis 100 ccm Wasser hinzugefügt. Ebensoviel Flüssigkeit wird dann wieder abgetrieben. Das Destillat wird mit n/2 Natronlauge alkalisch gemacht und nach Zugabe einer kleinen Menge Silbernitrat anreichernd destilliert. Im Enddestillat wird der Methylalkohol auf kolorimetrischem Wege ermittelt. Auf diese Weise untersuchten wir sowohl Zigarren-, Zigaretten- als auch Rauchtabak-sorten und erhielten die Werte, die in *Tabelle II* verzeichnet sind.

Tabelle II.

Nr.	Tabaksorten	Gehalt an Trocken- substanz in %	‰ Methylalkohol berechnet auf Trockensubstanz			
			Gesamt- Methyl- alkohol	Pektin- Methyl- alkohol	ätherartig geb. Methyl- alkohol	im Rauch- versuch gef. Methylalk.
1	Massary	92,80	4,20	1,71	2,49	2,13
1a	Zigaretten (mit Papier)	92,80	4,47	1,69	2,78	2,10
2	Garbaty Marke A	89,59	5,70	3,49	2,21	2,01*
2a	Zigarettentabak	89,59	5,77	3,49	2,28	2,34*
3	Garbaty M. A B	87,70	4,85	1,48	3,37	2,85*
3a	Zigarettentabak	87,70	4,85	1,88	2,97	2,68*
4	Garbaty M. A E	88,90	5,62	3,70	1,92	2,52*
4a	Zigarettentabak	88,90	5,62	3,70	1,92	2,68*
5	Meisterwerk	91,07	2,27	0,45	1,82	0,60
5a	(Flor fina) Zigarrentabak	91,07	2,47	0,65	1,82	0,64
6	Brasil (Primado)	94,93	2,16	0,26	1,90	0,31*
6a	Brasiliana) Zigarrentabak	94,93	2,23	0,24	1,99	0,25*
7	Shenandoah,	90,59	3,46	2,05	1,41	1,43*
7a	feinst. aromat. Krull-Pfeifen- tabak					
		90,59	3,64	2,39	1,25	1,29*

* bedeutet: in Pfeife verrauht.

B. Bestimmung der einzelnen Methylalkohol liefernden Fraktionen der vorbehandelten Tabaksubstanz.

Die Auslaugung des Tabaks geschah auf verschiedene Weise:

a) Je 100 g Zigarettentabak *Garbaty*, Marke A. B., wurden bei 45° mit je 1,5 Liter destillierten Wassers so oft ausgezogen — etwa zehn- bis zwölfmal —, bis im Filtrat die Nikotinprobe mit Phosphorwolframsäure negativ ausfiel. Der Rückstand nach der Wasserbehandlung wog nach Trocknung an der Luft 40 g.

Tabelle III.

Tabaksorten	Gehalt an Trocken- substanz in %	% Methylalkohol berechnet auf Trockensubstanz			
		Gesamt- Methyl- alkohol	Pektin- Methyl- alkohol	ätherartig geb. Methyl- alkohol	im Rauch- versuch gef. Methylalk.
Zigarettentabak:					
a) Garbaty A.B.	87,70	4,85	1,88	2,97	2,75
Nach Extraktion mit H ₂ O bei 45°:					
a) getrockn. Rückst.	40,78	3,42	1,77	1,65	1,70
b) Wasserauszug . .	45,46	0,17	0,09	0,08	—
Zigarettentabak:					
b) Garbaty A.B.	87,70	4,85	1,88	2,97	2,75
Nach Extraktion mit 90%igem Alkohol:					
a) getrockn. Rückst.	49,61	4,19	1,72	2,47	1,43
b) Alkoholauszug . .	39,03	0,61	0,04	0,57	—
c) Dudenstädt. Tabak.	89,00	4,74	4,00	0,74	—
Nach Extraktion mit H ₂ O bei 100°:					
a) getrockn. Rückst.	42,73	2,09	0,09	2,00	0,17
b) Wasserauszug . .	39,75	1,13	0,16	0,97	—
d) Seckenheimer Tabak.	86,44	4,57	2,60	1,97	—
Nach Extraktion mit H ₂ O bei 100°:					
a) getrockn. Rückst.	43,65	1,98	0,11	1,87	—
b) Wasserauszug . .	40,75	1,60	0,10	1,50	—

Der in Lösung gegangene Anteil¹ wurde auf dem Wasserbad bis zur Sirupkonsistenz eingedampft; er wog dann 46 g. Von dem auf ein bestimmtes Volumen mit Wasser aufgefüllten Extrakt wurde ein aliquoter Teil weiter verarbeitet. Sowohl im Rückstande als im wässerigen Auszuge bestimmten wir den Gehalt an esterförmigem Methylalkohol wie auch an Gesamtmethylalkohol.

10 g des getrockneten Rückstandes wurden außerdem in einer Porzellanpfeife verraucht und die kondensierten Dämpfe auf ihren Gehalt an Methylalkohol analysiert.

b) Wir extrahierten ferner je 100 g Zigarettentabak *Garbaty*², Marke A. B., mit 90%igem Äthylalkohol bei 78° so lange, daß nur ein schwach hellgelbes Filtrat abfloß und dieses Filtrat höchstens einen minimalen Rückstand beim Abdampfen hinterließ. Diese Auslaugung beansprucht viel Zeit. Die restierenden Blatteile wurden an der Luft

¹ Die hohen Extraktzahlen sind vielleicht auf die Gegenwart von Zusatzmitteln zum Rohtabak zurückzuführen; möglicherweise werden auch Zersetzungsprodukte des Pektins und Lignins löslich.

² Wir danken der Zigarettenfabrik *J. Garbáty* in Berlin für die Abgabe unverarbeiteten Tabaks.

getrocknet, ihr Gewicht machte 50 g aus. Der im Vakuum vom Alkohol befreite lösliche Anteil wurde auf dem Wasserbade abgedampft und hinterließ einen Rückstand von 39 g. Auch in diesen beiden Portionen bestimmten wir den locker und fest gebundenen Methylalkohol und verrauchten außerdem 10 g des Blattrückstandes am Apparat in einer Pfeife.

c) Schließlich extrahierten wir noch je 100 g Dudenstädter Tabak bei 100° zwölfmal mit je 1 1/2 Liter Wasser, bis das Filtrat keine Naphthoresorcinprobe mehr gab. Die Weiterbearbeitung des 43 g betragenden Rückstandes und des 40 g wiegenden Extrakts mit Wasser erfolgte, wie oben angeführt ist.

d) In gleicher Weise extrahierten wir Seckenheimer Tabak (siehe die Zahlen der Tabelle).

Tabelle III enthält die gewonnenen Daten.

C. Rauchversuche am mechanisch wirkenden Apparat.

An dem unseren Zwecken angepaßten Apparat zur Nachahmung des Rauchaktes stellten wir mit verschiedenen Tabaksorten Rauchversuche an. Die Kondensation der Dämpfe in den beiden, in flüssige Luft tauchenden Péligröttröhen gelang vollständig, wenn eine Zigarre langsam verraucht wurde, natürlich auch bei einzeln verrauchten Zigaretten. Bei entsprechender Größe des Niveaugefäßes, mit dem das intermittierende Rauchen herbeigeführt wird, sowie bei Regelung des Wasser-zu- und -ablaufes waren auch Pfeifen verwendbar. Die verschiedenen Tabaksorten wurden stets in Porzellanpfeifen verraucht, um einen etwaigen Einfluß der Wandung bei Holzpfeifen auszuschließen.

Wenn die Menge der Rauchprodukte zu groß wird, verstopfen sich die Péligröttröhen, und es wird somit das „unterbrochene Rauchen“ unmöglich. Die Zeitdauer konnte vollständig geregelt werden und die Intermissionen erfolgten in Pausen von etwa 10 Sekunden, wenn der Durchmesser des Niveaugefäßes durchgehends 4 cm, seine Höhe 20 cm und die Weite des Abflußrohres 2 cm betrug.

Wir verwendeten für Rauchversuche in Porzellanpfeifen je 10 bis 20 g Zigaretten-, Zigarren- oder Pfeifen-tabak und überzeugten uns durch Doppelversuche davon, daß man tatsächlich mit dem selben Material hinreichend übereinstimmende Werte erzielt. In Vorversuchen mit Zigaretten der Firma *Massary* und mit amerikanischen Zigarren konnten wir durch Verarbeitung des bräunlich gefärbten Kondensats auf die beschriebene Weise feststellen, daß der Methylalkoholgehalt des Zigarettentabakrauchs höher ist als der des Zigarrentabakrauchs. Über die genau ausgeführten Versuche geben die Zahlen Aufschluß, die in den letzten Kolumnen der Tabellen II und III stehen.

D. Rauchversuche am Menschen.

Zum Schluß seien Daten für Rauchversuche am Menschen mitgeteilt. (Wie diese Versuche angestellt worden sind, geht aus dem theoretischen Teil hervor.)

Tabelle IV.

Versuche am Menschen über die Abgabe von dampfförmigen Methylalkohol nach Einatmung von Tabakrauch.

Nr.	Zigarettenmarke Massary	Vorlagen	‰ Methylalkohol berechnet auf verrauchte Trockensubstanz
1	10 Stück = 9 g Tabak *	Eiswasser	0
2	10 " = 9 g "	Eiswasser + CaCl ₂	0
3	10 " = 9 g "	Flüssige Luft	0,21

*) Lufttrocken. Nach Abzug der Stummel betrug die wirklich verrauchte Menge 5,82 g. Über die Verteilung des Methylalkohols im Material dieser Zigarette geben die Daten der Tabelle II Aufschluß.

In anderen Fällen wurde in der exhaliierten Atemluft kein Holzgeist mehr gefunden; er war demnach vollkommen beim Rauchakt resorbiert.

Über die asymmetrische Wirkungsweise der Phosphatase und eine Methode zur biochemischen Darstellung der beiden entgegengesetzt drehenden Alkohole aus ihren Racematen¹.

Von

Carl Neuberg, Joachim Wagner und Kurt P. Jacobsohn.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Vor einiger Zeit haben wir darauf aufmerksam gemacht², daß die *Phosphatase* nicht nur die natürlich vorkommenden Phosphorsäure-ester angreift, die Derivate von *Polyhydroxylverbindungen* (Glycerin, Zucker, Inosit) sind, sondern daß sie auch die synthetisch bereiteten Phosphorsäure-ester einfacher Alkohole zu hydrolysieren vermag. Besonders bemerkenswert erscheint uns, daß die *primären und sekundären Phosphorsäure-ester der Phenole* ebenfalls enzymatisch gespalten werden. Die Tätigkeit des Fermentes erstreckt sich ferner auch auf *Pyro-phosphorsäure-ester*³, von denen Vertreter bisher in der Natur nicht aufgefunden sind. Der Wirkungsbereich⁴ der Phosphatase erweist sich aber als noch weiter; denn aus unseren im folgenden mitzuteilenden Ergebnissen geht hervor, daß sie *Phosphorsäure-ester der hydroaromatischen Reihe* gleichermaßen zu zerlegen imstande ist.

Die auf Verbindungen so verschiedenen Baues sich erstreckende Spaltungskraft der Phosphatase glauben wir mit der Wichtigkeit dieses Enzyms in Zusammenhang bringen zu dürfen, insofern als organische Phosphorsäure-derivate, die den verschiedensten Gruppen zugehören, der Zahl nach in der Natur äußerst verbreitet sind.

Durch ein geringes Auswählungsvermögen ist die Phosphatase unterschieden von der Sulfatase, für die wir engere Grenzen der Angriffsmöglichkeiten früher nachgewiesen haben⁵.

¹ Vorgetragen in der Sitzung der Deutschen Chemischen Gesellschaft am 16. Mai 1927.

² C. Neuberg und J. Wagner, diese Zeitschr. 171, 485, 1926; R. Iwatsuru, ebendasselbst 178, 348, 1926.

³ C. Neuberg und J. Wagner, l. c.

⁴ Vgl. die enzymatische Hydrolyse künstlich phosphorylierter Protosen, C. Neuberg und W. Oertel, diese Zeitschr. 60, 506, 1914.

⁵ C. Neuberg und J. Wagner, diese Zeitschr. 161, 492, 1925; 174, 457, 1926; Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 56, 334, 1927.

Man könnte somit a priori glauben, daß es sich bei der Hydrolyse von Phosphorsäure-estern gar nicht um die Beteiligung eines eigentlichen Fermentes, sondern um einen häufig vorkommenden Aktivator handle, wenngleich der Verlauf der durch die Phosphatase bewirkten Spaltung durchaus den Charakter enzymatischer Hydrolysen aufweist. Das einzige sichere Kriterium für Fermentwirkungen liegt nun nach den von R. Willstätter und Fr. Memmen¹ darüber entwickelten Anschauungen in der auswählenden Wirkung, die sich in stereochemischer Spezifität offenbart. Wir hielten es daher für außerordentlich wichtig, zu untersuchen, ob eine stereochemische Spezifität für die Phosphatase existiert. Dies mußte bei der Einwirkung des Agens auf Phosphorsäure-ester racemischer Alkohole zutage treten. Als ein bequem zugängliches Testobjekt wählten wir den bisher nicht dargestellten *Ortho-phosphorsäure-ester des racemischen Borneols*, $C_{10}H_{17} \cdot O \cdot PO(OH)_2$, nachdem wir uns vorher davon überzeugt hatten, daß die Phosphatase die gleichfalls bislang unbekannten aktiven Komponenten des Mono-bornylphosphorsäure-esters angreift. Wir finden, daß der racemische Ester asymmetrisch gespalten wird.

Nach den Verfahren der Pilzvegetation kann man den einen Antipoden gewinnen, im Idealfalle die Hälfte des Ausgangsmaterials; eine Methode, zu beiden Raumformen desselben Alkohols auf biochemischem Wege zu gelangen, ist bis jetzt nicht beschrieben.

Für Säuren ist ein solches Prinzip vorgebildet in den Untersuchungen von H. D. Dakin², die dann mit den gleichen Ergebnissen von Willstätter und Memmen (l. c.) sowie von P. Rona und R. Ammon³ angestellt sind. Alle diese Autoren haben gezeigt, daß man beispielsweise den Äthyl-ester der racemischen Mandelsäure durch Lipasen asymmetrisch verseifen kann. Wenn man den Versuch rechtzeitig unterbricht, erhält man einen Überschuß an aktiver freier Mandelsäure, während der unzerlegte Anteil neben racemischem Ester den Ester der entgegengesetzt drehenden Säure einschließt; aus ihm könnte man also dann auf rein chemischem Wege den Antipoden der Säure herausarbeiten. Wartet man lange genug, so verwischt sich die Ungleichheit der Reaktionsgeschwindigkeiten oder im Sinne von M. Bodenstein⁴ die hemmende Wirkung der Spaltprodukte, und es entsteht auch durch die enzymatische Hydrolyse inaktive Mandelsäure.

Die Lösung der Aufgabe, gleichzeitig die beiden Antipoden eines optisch-aktiven Alkohols auf biochemischem Wege in freier Form und in einem Prozeß zu gewinnen, haben wir mit Hilfe der Phosphatase

¹ R. Willstätter und Fr. Memmen, H. 138, 216, 1924.

² H. D. Dakin, Journ. of Physiol. 30, 253, 1904; 32, 199, 1905.

³ P. Rona und R. Ammon, diese Zeitschr. 181, 49, 1927.

⁴ M. Bodenstein und Dietz, Zeitschr. f. Elektrochem. 12, 605, 1906.

bewerkstelligt. Nach der von uns mehrfach angewendeten Methode der Phosphorylierung in Pyridin kann man leicht aus inaktivem Borneol den erwähnten *Mono-borneol-ester der Orthophosphorsäure*, $C_{10}H_{17} \cdot O \cdot PO(OH)_2$, darstellen. Es ist eine schön kristallisierte und sehr beständige Substanz, deren Alkalisalze in Wasser löslich sind. Läßt man auf diese nun *pflanzliche Phosphatase*¹ einwirken, so erhält man ein sehr prächtiges Bild. Die klare Lösung trübt sich nach wenigen Stunden unter Abscheidung eines Magmas von kristallisiertem Borneol. Filtriert man dieses rechtzeitig ab und reinigt es durch Destillation mit Wasserdampf, so gewinnt man *links-Borneol*, das zu rund 25 % optisch-aktiv ist.

Setzt man die enzymatische Spaltung des Rückstandes, also des unverseiften Bornyl-phosphorsäure-esters, fort, so gelangt man zu einem Borneol, das nunmehr ungefähr im entsprechenden Prozentsatz *rechts-Borneol* enthält.

Damit ist es, soweit wir sehen, zum ersten Male gelungen, mit einem und demselben Ferment, also *mit einem Enzym der selben Herkunft*, einfach durch eine fraktionierte Verwertung seiner hydrolysierenden Kraft die *freien Alkohole von dem entgegengesetzten Drehungsvermögen* zu isolieren.

Zu den in vitro ausgeführten asymmetrischen Synthesen bietet diese Erscheinung ein Gegenstück. Wenn man z. B., wie *W. Marckwald* und *A. McKenzie*² in ihren grundlegenden Untersuchungen, racemische Mandelsäure mit l-Menthol *unvollständig verestert*, so findet man, daß die d-Säure schneller in den l-Menthyl-ester umgewandelt wird, als die l-Säure. Man kann also im Prinzip auf diese Weise die racemische Säure zerlegen, aber es müssen ersichtlich sowohl Alkohol als Säure asymmetrische Kohlenstoffatome enthalten. Wenn in dem Versuch von *G. Bredig* und *K. Fajans*³ inaktive Camphercarbonsäure durch ein Alkaloid zerlegt und aktiver Campher im kleinen Überschuß gebildet wird, so handelt es sich gleichfalls um Agenzien, bei denen Säure wie Base asymmetrischen Bau aufweisen. In unserem Falle des d,l-Borneol-phosphorsäure-esters enthält lediglich der Alkohol Elemente der Asymmetrie, die Phosphorsäure natürlich nicht, und wenn trotzdem die asymmetrische Spaltung zustande kommt, so handelt es sich eben um einen biologischen Vorgang, bei dem das Ferment ähnlich wirkt wie das aktive Menthol im *Marckwald-Mc Kenzieschen* Versuch. Übrigens hat *Dakin* (l. c.) bei der Einwirkung von Lipase auf Phenyl-äthyl-carbinol-acetat eine Gesamthydrolyse zu 25 % erreicht; das mit Chloroform extrahierte Gemisch der Reaktionsprodukte aus 2 g Ausgangs-

¹ Versuche mit *animalischer Phosphatase* sollen folgen.

² *W. Marckwald* und *A. McKenzie*, B. 34, 469, 1901.

³ *G. Bredig* und *K. Fajans*, B. 41, 752, 1908; *K. Fajans*, Zeitschr. f. physik. Chem. 78, 25, 1910.

material besaß eine schwache Linksdrehung ($-0,31^{\circ}$). Worauf diese zu beziehen ist, hat der Autor unentschieden gelassen; reines Phenyl-äthyl-carbinol¹ hat eine Drehung von $27,35^{\circ}$.

Bemerkenswerterweise verläuft, wie wir gefunden haben, auch die Synthese von Menthol-glucosiden aus Acetobromglucose und d, l-Menthol unter der Einwirkung von Chinolin asymmetrisch in dem Sinne, daß bei der Entstehung des α -Glucosids die l-Form, bei der Entstehung des β -Glucosids die d-Form in weitgehendem Maße bevorzugt wird. Beim Aufbau des β -Glucosids mit Anwendung von Silbercarbonat erfolgt ebenfalls asymmetrische Aufteilung des d, l-Menthols. Über diese Beobachtungen sowie über die Verhältnisse, die bei der enzymatischen Bildung und Zerlegung von Glucosiden obwalten, sobald die Alkoholkomponente racemisch ist, werden wir später ausführlich berichten.

Indem wir die *stereochemisch auswählende Wirkungsart der Phosphatase* dargetan haben, glauben wir einen Beweis für den enzymatischen Charakter der Reaktion geliefert zu haben. Wie ersichtlich, schließt das angegebene Verfahren eine Methode in sich, welche die gleichzeitige biochemische Gewinnung der beiden optischen Antipoden eines racemischen Alkohols gestattet.

Versuchstell.

Darstellung der Borneol-phosphorsäuren.

88 g Phosphoroxychlorid werden tropfenweise in einem Rundkolben mit 350 ccm trockenem, über Bariumoxyd destillierten Pyridin versetzt. Zu dieser Mischung werden 60 g Borneol, die in möglichst wenig Pyridin gelöst sind, unter guter Kühlung mit Eiswasser und unter häufigem Schütteln tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsprodukt, das jetzt zum Teil aus einem Brei von weißen, nadelförmigen Kristallen besteht, bleibt 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und wird dann mit 40 %iger Kalilauge bis zur alkalischen Reaktion vermischt. Hierbei muß man für sehr gute Kühlung Sorge tragen, zweckmäßig ist es auch, die ersten Anteile der Kalilauge in starker Verdünnung mit Wasser hinzuzugeben, da die Reaktion im Anfang lebhaft ist. Darauf wird mit etwa dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, bis eine einigermaßen klare, gelb oder hellbraun gefärbte Lösung entstanden ist. Aus dieser Flüssigkeit schlägt man die *freie Borneol-phosphorsäure* mit etwa dem gleichen bis doppelten Volumen 25 %iger Schwefelsäure nieder; sie fällt zunächst in Form von weißen amorphen Flocken aus. Gleichzeitig wird das Pyridin, das in der Lösung vorhanden ist, in sein schwefelsaures Salz umgewandelt. Die Säure wird nun mit Äther ausgeschüttelt, in den sie äußerst leicht übergeht. Die ätherische Lösung wird zweimal mit Wasser gewaschen und dann mit frisch geglühtem Natriumsulfat gut getrocknet. Nach dem Verjagen des Äthers hinterbleibt ein äußerst zähflüssiger, öliges Rückstand, der oft schon in diesem Zustande im Exsikkator zu einer weißen Masse erhärtet. Die Reinigung des Rohprodukts gestaltet sich zur Entfernung von etwa mit

¹ R. H. Pickard und J. Kenyon, Chem. Centralbl. 1911, I, 713.

ausgefallenem Borneol folgendermaßen: Die ölige Substanz wird unter Rühren langsam mit *n* Kalilauge vermischt. Einige Tropfen hinzugefügtes Phenolphthalein zeigen einen Überschuß an Alkali an. Die schwach alkalische Lösung wird durch Einleiten von Kohlensäure gegen den Indikator neutral gemacht und dann zur Entfernung von Borneol- sowie Pyridinresten drei- bis viermal mit Äther ausgeschüttelt. Der gelöste Äther wird durch einen kräftigen Luftstrom verjagt, wobei sich immer etwas Borneol, das in dem Gemisch (hydrotropisch) in Lösung gehalten wird, ausscheidet. Hiervon wird abfiltriert und aus der nun völlig klaren und höchstens schwach gelb gefärbten Lösung die Säure erneut mit 25%iger Schwefelsäure ausgefällt. Die weitere Behandlung ist die gleiche wie beim Rohprodukt; unter Umständen muß man dieses Reinigungsverfahren noch ein zweites Mal zur Anwendung bringen. Das gereinigte Produkt verwandelt sich im evakuierten Exsikkator meistens sehr rasch in eine weiße Kristallmasse, die nun noch aus einem Gemisch von Benzol und Petroläther umkristallisiert wird. Dies gelingt aber nur, wenn die Substanz auch von den letzten Spuren von Äther sorgfältig befreit ist. Die trockene Rohsäure wird zerkleinert und in der gerade zur Lösung erforderlichen Menge trockenen Benzols aufgelöst und die Lösung, wenn es erforderlich ist, filtriert. Darauf vermischt man sie unter gleichzeitiger Eiskühlung mit etwa der zehnfachen Menge Petroläther. Die Säure scheidet sich meist rasch in nadelförmigen Kristallen aus, die abgesaugt und mit Petroläther mehrmals gewaschen werden. Zuweilen fiel die Säure bei der ersten Kristallisation aus Benzol-Petroläther nur langsam aus, alle weiteren Kristallisationen aus dem Gemisch verliefen aber stets äußerst rasch und fast quantitativ.

Die im evakuierten Exsikkator getrocknete Substanz stellt ein völlig weißes Pulver dar, bei langsamer Kristallisation bilden sich oft bis zu einem Zentimeter lange nadelförmige Kristalle. Die Ausbeute an gereinigter Säure betrug 50 bis 60 g aus 60 g Borneol.

Die Borneol-phosphorsäure ist in Wasser vollkommen unlöslich; löslich ist sie in den gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln (Aceton, Chloroform, Eisessig, Methyl- und Äthylalkohol, Benzol und Toluol, äußerst leicht löslich in Äther). Unlöslich ist sie dagegen in Petroläther und in Ligroin. Aus der Lösung ihres Kaliumsalzes wird die Säure außer durch die starken Mineralsäuren auch noch durch folgende Säuren ausgefällt: Trichloressigsäure, Phosphorsäure, Citronensäure, Oxalsäure und Weinsäure, nicht gefällt wird sie von Essigsäure.

Eine 4%ige Lösung des Kaliumsalzes der Borneol-phosphorsäure gibt folgende Fällungsreaktionen:

2 ccm Lösung + 2 ccm Reagens.

m/20 BaCl_2	weiße amorphe Fällung,
m/20 CaCl_2	weiße Fällung, Nadeln,
m/20 SrCl_2	zuerst gallertartig, dann Nadelbüschel,
m/20 MgSO_4	weiße Fällung,
m/20 MnSO_4	weiße nadelförmige Kristalle,
m/20 FeCl_3	weißer amorpher Niederschlag,
m/20 BeSO_4	„ „ „
m/20 CdCl_2	„ „ „
m/1 Pb-Acetat	„ „ „
m/20 Uranylacetat	gelblicher Niederschlag,
m/2 $\text{Hydrazin-chlorhydrat}$	lange, wohlausgebildete Nadeln,
m/2 AgNO_3	weiße amorphe Fällung.

Eine konzentrierte Lösung des Kaliumsalzes zeigt auch *hydrotropische Eigenschaften*, z. B. gegenüber Amylalkohol, Anilin sowie Cyklohexanol.

Dargestellt haben wir die *Phosphorsäure-ester des l-Borneols, des d-Borneols und des racemischen Borneols*. Wir geben zunächst die physikalischen Konstanten der drei Verbindungen an und nachher die mit den Substanzen vorgenommenen Analysen.

	Schmelzpunkte
l-Säure	156°
d-Säure	154—155°
d, l-Säure	155—156°

Eine Veränderung der Substanzen vor dem Schmelzen war nicht zu bemerken.

Spezifische Drehungen.

Zur Bestimmung der spezifischen Drehung wurde die Substanz zu einer etwa 5%igen Lösung in absolutem Alkohol oder Benzol gelöst. Polarisiert wurde ausnahmslos in einem 2-dm-Rohr.

Anfangs stand uns ein *vollkommen* inaktives Borneol nicht zur Verfügung, so daß auch die d, l-Borneol-phosphorsäure entsprechend der Drehung des Ausgangsmaterials eine schwache Drehung im Rechtssinne aufweist.

$[\alpha]_D$ war:

	Alkohol	Benzol
l-Säure	— 22,61°	— 22,36°
d-Säure	+ 23,26	—
d, l-Säure	+ 2,85	+ 2,66

Bei weiterem Umkristallisieren änderte sich die spezifische Drehung nicht mehr merkbar.

Mit den drei Substanzen führten wir folgende Analysen aus:

1. Phosphorbestimmung in der freien Säure,
2. Titration der freien Säure,
3. Kohlenstoff-Wasserstoff-Bestimmung in der freien Säure,
4. Phosphorbestimmung im Barium-salz,
5. Bariumbestimmung im Barium-salz.

Analysen-Methodik.

Phosphor-bestimmungen.

Die zur Konstanz getrocknete und genau abgewogene Substanz, ganz gleich, ob es sich um die freie Säure oder um das Bariumsalz handelt, wird in einer Platinschale mit der 30fachen Menge Soda-Salpeter-mischung (1 : 1) aufgeschlossen; die Schmelze ist dann wie üblich behandelt.

Die *Titration* der freien Säuren führten wir in absolut alkoholischer Lösung gegen n/10 Kalilauge mit Phenolphthalein als Indikator aus. Der Umschlagspunkt ist nicht sehr scharf; Methylorange kann nicht zur Anwendung gelangen, da damit kein Umschlagspunkt zu erreichen ist.

Zur *Kohlenstoff-Wasserstoff-bestimmung* mischten wir die Substanz mit Kalium-di-chromat und erzielten dadurch sehr leichte Verbrennbarkeit.

Das *Bariumsalz* stellten wir für die Analyse auf folgende Weise her. 2 g freie Säure wurden in der gerade genügenden Menge n Kalilauge gelöst (2 Tropfen Phenolphthalein als Indikator) und mit einer konzentrierten Lösung von Bariumchlorid, die etwas mehr als die berechnete Menge Bariumchlorid enthielt, gefällt. Der weiße Niederschlag wurde auf der Nutsche abgesaugt und so lange mit kaltem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser vollkommen chlorfrei ablief. Das Salz wurde darauf zunächst im Exsikkator über Chlorcalcium und darauf im Hochvakuum bei 80 bis 100° über Phosphorpentoxyd zur völligen Gewichtskonstanz getrocknet. Die Phosphorbestimmung wurde genau in der gleichen Weise wie bei der freien Säure ausgeführt.

Zur *Bariumbestimmung* wurde das Bariumsalz unter Zusatz von Alkohol in Salzsäure gelöst, um die mit Säuren ausfallende freie Borneol-phosphorsäure in Lösung zu halten, und mit Schwefelsäure in der Siedehitze das Barium als Bariumsulfat ausgeschieden.

Analysenergebnisse.

a) l-Säure.

Phosphorbestimmung, freie Säure.

0,1963 g gaben 0,0945 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$,

0,2040 g „ 0,0948 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

$\text{C}_{10}\text{H}_{17} \cdot \text{PO}_4\text{H}_2$: Ber.: P = 13,2 %;

gef.: P = 13,4 %, P = 13,0 %.

Titration:

0,2020 g verbrauchten 17,10 ccm n/10 Natronlauge statt 17,25 ccm,

0,2096 g „ 17,80 „ n/10 „ „ 17,89 „

Ba-Salz der l-Säure.

Phosphorbestimmung.

0,2900 g gaben 0,0895 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

Bariumbestimmung.

0,2944 g gaben 0,1855 g BaSO_4 .

$\text{C}_{10}\text{H}_{17} \cdot \text{PO}_4\text{Ba}$: Ber.: Ba = 37,2 %, P = 8,4 %;

gef.: Ba = 37,1 %, P = 8,6 %.

b) d-Säure.

Phosphorbestimmung.

0,2424 g gaben 0,1156 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

$\text{C}_{10}\text{H}_{17} \cdot \text{PO}_4\text{H}_2$: Ber.: P = 13,2 %;

gef.: P = 13,3 %.

Titration:

0,2801 g verbrauchten 23,6 ccm n/10 Natronlauge statt 23,9 ccm,

0,2536 g „ 21,3 „ n/10 „ „ 21,6 „

c) *d, l-Säure.*

Phosphorbestimmung.

0,2718 g gaben 0,1303 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

Titration:

0,2278 g	verbrauchten	19,7 ccm	n/10 NaOH	statt	19,45 ccm
0,2221 g	„	19,1 „	n/10 NaOH	„	18,96 „
0,3129 g	„	26,6 „	n/10 NaOH	„	26,71 „

Kohlenstoff-Wasserstoff-bestimmung.

0,2236 g gaben 0,4170 g CO_2 und 0,1360 g H_2O . $\text{C}_{10}\text{H}_{17} \cdot \text{PO}_4\text{H}_2$: Ber.: C = 51,2, H = 6,5, P = 13,2 %;

gef.: C = 50,9, H = 6,8, P = 13,4 %.

Ba-Salz der d, l-Säure.

Phosphorbestimmung.

0,3069 g gaben 0,0952 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

Ba-Bestimmung.

0,1848 g gaben 0,1176 g BaSO_4 . $\text{C}_{10}\text{H}_{17} \cdot \frac{1}{2}\text{PO}_4\text{Ba}$: Ber.: P = 8,4 %, Ba = 37,2 %;

gef.: P = 8,6 %, Ba = 37,4 %.

Aus den angeführten Analysenzahlen folgt, daß überall die *Mono-bornyl-ortho-phosphorsäure*, $\text{C}_{10}\text{H}_{17} \cdot \text{O} \cdot \text{PO}_3\text{H}_2$, vorliegt.

Enzymatische Spaltungen.

Für die mit der gewonnenen Substanz anzustellenden Fermentversuche führten wir eine jede der freien Borneol-phosphorsäuren in das in Wasser leicht lösliche Di-kalium-Salz, $\text{C}_{10}\text{H}_{17} \cdot \text{O} \cdot \text{PO}_3\text{K}_2$, über. Zu diesem Zwecke wurde die Säure allmählich mit der gerade ausreichenden Menge an n/10 Kalilauge (Zugabe von 2 bis 3 Tropfen Phenolphthaleinlösung) versetzt; diese Lösung wurde mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und durch Zugabe von verdünnter Essigsäure auf ein p_{H} von 7,0 bis 7,2 eingestellt.

Diese Flüssigkeit wurde direkt für die biologischen Versuche verwendet, ihr Gehalt, auf freie Borneol-phosphorsäure bezogen, betrug 1 % in den Fällen, wo das Fermentpräparat in fester Form hinzugefügt wurde, und 2 %, wenn das Enzym in einem gleichen Volumen Wasser gelöst war; die Endkonzentration war dann wieder 1 %.

Als *Enzymmaterial* verwendeten wir verschiedene Proben von japanischer *Takadiastase*. Diese Präparate hatten sich in unseren erwähnten früheren Versuchen als verhältnismäßig reich an Phosphatase erwiesen.

Durch Beigabe von 1 % des Flüssigkeitsvolumens an Toluol verhindert man eine Bakterienentwicklung in den Ansatzlösungen. In den Fällen, wo wir eine Isolierung des fermentativ abgespaltenen und aus der Lösung ausgeschiedenen Borneols durchführten, arbeiteten wir ohne Antiseptikum, da die Versuche sich zumeist nur über wenige Tage erstreckten und während dieser Zeit das ausgeschiedene Borneol selbst sich in vollkommen ausreichendem Maße als Desinfizienz betätigt.

Die Ansätze wurden sämtlich in gut getrockneten Glasstöpselflaschen im Brutschrank bei 37 bis 38° belassen.

Eine Lösung des bornyl-phosphorsauren Kaliums von derselben Konzentration wie beim Hauptversuch wurde unter sonst völlig gleichen äußeren Bedingungen ohne Ferment aufgehoben, ebenso eine Lösung des Enzyms nur in Wasser.

Das fermentativ aus der organischen Bindung gelöste Phosphat wurde kolorimetrisch nach der Methode von *K. Lohmann* und *L. Jendrassik*¹ bestimmt. Einige Kubikzentimeter der Reaktionsflüssigkeit wurden filtriert, von der filtrierten Lösung ist 1 ccm verwendet.

Ansatz I.

Der erste Versuch sollte allgemein die Spaltbarkeit der synthetisch gewonnenen Verbindungen erweisen. Es wurden daher die l-Säure, die d-Säure und die d,l-Säure nebeneinander untersucht.

Stammlösungen.

Lösung A: 1 g d-Säure als Kaliumsalz in 100 ccm Wasser
 „ B: 1 g l-Säure „ „ „ 100 „ „
 „ C: 1 g d,l-Säure „ „ „ 100 „ „

Das p_H betrug in allen drei Fällen 7,0 bis 7,2.

I. Lösung A	50 ccm	II. Lösung A	50 ccm
Takaphosphatase	1 g	Toluol	0,5 „
Toluol	0,5 ccm		
III. Lösung B	50 ccm	IV. Lösung B	50 ccm
Takaphosphatase	1 g	Toluol	0,5 „
Toluol	0,5 ccm		
V. Lösung C	50 ccm	VI. Lösung C	50 ccm
Takaphosphatase	1 g	Toluol	0,5 „
Toluol	0,5 ccm		
VII. Wasser	50 ccm		
Takaphosphatase	1 g		
Toluol	0,5 ccm		

Der ursprüngliche Gehalt am ganzen anfänglich vorhandenen Phosphat wurde gleich nach Vermischen der Lösungen durch Veraschung der Ansatzlösungen bestimmt.

Hierzu wurden 10,0 ccm vom Reaktionsgemisch in der Platinschale mit Soda-Salpeter-mischung zur Trockne eingedampft und geschmolzen; in der Schmelze wurde der Phosphatgehalt wie gewöhnlich über die Molybdatverbindung durch Magnesia-fällung ermittelt.

Die folgende Tabelle gibt Auskunft über die Menge des abgespaltenen Phosphats und damit über die fermentative Zerlegung der organischen Phosphorverbindung.

¹ *K. Lohmann* und *L. Jendrassik*, diese Zeitschr. 178, 419, 1926.

Tabelle I.

Gesamtposphatgehalt¹ I: 3,882 mg P_2O_5 in 1 ccm
 „ III: 3,912 „ P_2O_5 „ 1 „
 „ V: 3,939 „ P_2O_5 „ 1 „
 „ VII: 0,776 „ P_2O_5 „ 1 „

Zeit	Aus 1 ccm Lösung abgespaltene Menge P_2O_5 in mg							Hydrolysen in %						
	I	II	III	IV	V	VI	VII	I	II	III	IV	V	VI	VII
Anfangs .	0,843	0,064	0,878	0,074	0,896	0,032	0,776	—	—	—	—	—	—	—
Nach 24 Stunden	3,770	0,065	3,790	0,074	3,428	0,030	0,780	96,4	—	96,0	—	83,2	—	—

Ansatz II.

Ein zweiter Versuch mit geringeren, zuvor gelösten Mengen des Ferments führte fast genau zur gleichen, sehr weitgehenden Zerlegung aller drei Verbindungen.

Stammlösungen.

Lösung A: 0,75 g Takaphosphatase in 50 ccm Wasser

„ B: 0,75 g d-Säure als Kaliumsalz in 50 ccm Wasser

„ C: 0,75 g l-Säure „ „ „ 50 „ „

„ D: 0,75 g d,l-Säure „ „ „ 50 „ „

I. Lösung B. . 20 ccm

II. Lösung B. . 20 ccm

„ A. . 10 „

Wasser. . . 10 „

Toluol . . . 0,3 „

Toluol . . . 0,3 „

III. Lösung C. . 20 ccm

IV. Lösung C. . 20 ccm

„ A. . 10 „

Wasser. . . 10 „

Toluol . . . 0,3 „

Toluol . . . 0,3 „

V. Lösung D. . 20 ccm

VI. Lösung D. . 20 ccm

„ A. . 10 „

Wasser. . . 10 „

Toluol . . . 0,3 „

Toluol . . . 0,3 „

VII. Lösung A. . 10 ccm

Wasser. . . 20 „

Toluol . . . 0,3 „

Tabelle II zeigt den Verlauf der Spaltung.

¹ Nach Veraschung enthalten die Lösungen I, III und V die angegebenen Mengen Gesamt- P_2O_5 . In Lösung VII findet man die im Ferment allein vorhandene Qualität P_2O_5 . In den Kolonnen II, IV und VI ist die kleine, konstant bleibende Menge präformierten anorganischen Phosphats verzeichnet.

Tabelle II.

Gesamtphosphatgehalt¹ I: 3,034 mg P_2O_5 in 1 ccm" III: 3,034 " P_2O_5 " 1 "" V: 3,033 " P_2O_5 " 1 "" VII: 0,190 " P_2O_5 " 1 "

Zeit	Aus 1 ccm Lösung abgespaltene Menge P_2O_5 in mg							Hydrolysen in %						
	I	II	III	IV	V	VI	VII	I	II	III	IV	V	VI	VII
Anfangs .	0,259	0,042	0,296	0,063	0,290	0,042	0,190	—	—	—	—	—	—	—
Nach 24 Stunden	2,640	0,042	2,640	0,069	2,514	0,053	0,191	85,8	—	85,6	0,02	81,1	0,04	—

Ansatz III.

Die folgenden Versuche dienten dazu, die asymmetrische Einwirkung der Phosphatase auf die d, l-Borneol-phosphorsäure zu untersuchen. Verwendet wurde zunächst die d, l-Säure, welche noch eine schwache Rechtsdrehung aufweist.

Lösung A: 5 g d, l-Säure als Kaliumsalz in 250 ccm H_2O " B: 1,5 g Takaphosphatase " 500 " H_2O

I. Lösung A . . . 225 ccm II. Lösung A . . . 25 ccm

Lösung B . . . 225 " Wasser . . . 25 "

III. Lösung B . . . 25 ccm

Wasser . . . 25 "

 $pH = 7,1$.

Gehalt der Lösung I an Gesamtphosphat (10 ccm verascht, Molybdän- und Magnesia-fällung) 3,687 mg P_2O_5 in 1 ccm.

Tabelle III zeigt die Hydrolyse, gemessen an der Phosphatabspaltung.

Tabelle III.

Gesamtphosphatgehalt: 3,687 mg P_2O_5 in 1 ccm.

Zeit	Aus 1 ccm Lösung abgespaltene Menge P_2O_5 in mg			Hydrolyse in %		
	I	II	III	I	II	III
Anfangs	0,422*	0,095	0,327	—	—	—
Nach 20 Stunden . . .	1,257	—	—	25,6	—	—
" 30 "	1,389	—	—	29,6	—	—
" 50 "	1,650	—	—	37,6	—	—
" 60 "	1,760	—	—	41,0	—	—
" 70 "	2,514	—	—	64,1	—	—
" 100 "	2,934	0,093	0,328	76,9	—	—

* In den Werten dieser Kolumne ist das Phosphat aus dem Ferment mit enthalten.

¹⁾ Nach Veraschung enthalten die Lösungen I, III und V die angegebenen Mengen Gesamt- P_2O_5 . In Lösung VII findet man die im Ferment allein vorhandene Qualität P_2O_5 . In den Kolumnen II, IV und VI ist die kleine, konstant bleibende Menge präformierten anorganischen Phosphats verzeichnet.

Die polarimetrische Prüfung des ausgeschiedenen und *abfiltrierten* Borneols geschah in der folgenden Weise. Nach dem Filtrieren der Reaktionsflüssigkeit wird das Borneol auf dem Filter mehrmals mit Wasser gewaschen. Darauf wird das ganze Filter samt Inhalt in einen Fraktionierkolben übergeführt und daraus das Borneol mit Wasserdampf abgetrieben. Der Hauptteil der Substanz bleibt im Kühler und wird daraus mit Äther in einen Scheidetrichter übergeführt, in welchem man das wässrige Destillat aufgefangen hat. Nach dem Ausschütteln wird die ätherische Lösung mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet, und der Äther sodann aus einem zuvor gewogenen Kölbchen verdunstet. Das restierende Borneol wird im Exsikkator getrocknet, gewogen und in Benzol oder Alkohol polarisiert. Der Schmelzpunkt wird ebenfalls bestimmt.

Fraktion I. Nach 30 Stunden (Spaltung 29,6 %) 0,850 g. Schmelzpunkt 202 bis 203°. $[\alpha]_D = -4,6^\circ$ ($\alpha = -0,42^\circ$, $l = 2$, $c = 4,608$).

Fraktion II. Nach 70 Stunden (Spaltung 64,1 %) 0,627 g. Schmelzpunkt = 203 bis 204°. $[\alpha]_D = +2,4^\circ$ ($\alpha = +0,21^\circ$, $l = 2$, $c = 4,362$).

Fraktion III. Nach 100 Stunden (Spaltung 76,9 %) 0,363 g. Schmelzpunkt = 202°. $[\alpha]_D = +14,4^\circ$ ($\alpha = +1,33^\circ$, $l = 2$, $c = 4,614$).

Nach der Anfangs-Phosphat-bestimmung können aus den in 450 ccm vorhandenen 4,85 g Säure bei einer Spaltung von 77 % 1,9 g Borneol frei werden. Isoliert wurden 1,84 g = 94,4 %.

Ansatz IV.

Bei diesem Versuch wurde die d, l-Säure, die ja noch eine schwache Rechtsdrehung von $[\alpha]_D = +2,66^\circ$ besaß, mit l-Säure von der Drehung $[\alpha]_D = -22,36^\circ$ derart versetzt, daß die Drehung der Mischung absolut 0° war.

Stammlösungen: A 4 g Säure als Kaliumsalz in 200 ccm H_2O ,
B 3 g Takaphosphatase „ 200 „ H_2O .

I. Lösung A . . 180 ccm II. Lösung A . . 20 ccm
„ B . . 180 „ Wasser . . . 20 „

Gehalt der Lösung I an Gesamt-phosphat: 3,355 mg P_2O_5 in 1 ccm.

Weil das verwendete Taka-enzym keine irgendwie ins Gewicht fallende Menge von organischen Phosphaten enthält, so wurde eine wässrige Lösung des Ferments allein in den folgenden Versuchen nicht mehr angesetzt.

Aus Tabelle IV ist die Phosphat-abspaltung zu ersehen.

Tabelle IV. Gesamtphosphatgehalt: 3,355 mg P_2O_5 in 1 ccm.

Zeit	Aus 1 ccm Lösung abgespaltene Menge P_2O_5 in mg		Hydrolysen in %	
	I	II	I	II
Anfangs	0,454*	0,085	—	—
Nach 1 Tag	0,910	—	15,7	—
„ 2 Tagen	1,056	—	20,8	—
„ 3 „	1,258	0,085	27,7	—
„ 4 „	2,200	—	60,2	—
„ 5 „	2,401	—	67,1	—
„ 6 „	2,934	0,085	85,5	—

* In dem Werten dieser Kolumne ist das Phosphat aus dem Ferment mit enthalten.

Die Isolierung des ausgeschiedenen Borneols geschah in genau der gleichen Weise wie bei Versuch III.

Fraktion I. Nach 2 Tagen (Spaltung 20,8 %) 0,277 g. Schmelzpunkt = 203 bis 204°. $[\alpha]_D = -9,02^\circ$ ($\alpha = -0,74^\circ$, $l = 2$, $c = 4,104$).

Fraktion II. Nach 4 Tagen (Spaltung 60,2 %) 0,832 g. Schmelzpunkt = 203 bis 204°. $[\alpha]_D = -5,87^\circ$ ($\alpha = -0,48^\circ$, $l = 2$, $c = 4,086$).

Fraktion III. Nach 6 Tagen (Spaltung 85,5 %) 0,648 g. Schmelzpunkt = 203°. $[\alpha]_D = +6,00^\circ$ ($\alpha = +0,53^\circ$, $l = 2$, $c = 4,416$).

Die Gesamtmenge des ausgeschiedenen Borneols betrug 1,757 g.

3,98 g Borneol-phosphorsäure, die nach der Anfangs-phosphat-bestimmung in 360 ccm vorhanden sind, können bei einer Spaltung von 85 % 2,23 g Borneol liefern.

Gefunden wurden also 78,8 % von der möglichen Menge.

Ansatz V.

Zu diesem Versuch stellten wir eine gänzlich inaktive Borneol-phosphorsäure dadurch her, daß wir die freien d- und l-Borneole von genau bekannten Drehungen zu einem vollkommen inaktiven Borneol vermischten und dieses dann in gewohnter Weise in den Phosphorsäure-ester verwandelten. Die gewonnene Borneol-phosphorsäure wies nicht die geringste Drehung auf.

Stammlösungen: A 4 g Säure als Kaliumsalz in 200 ccm H_2O ,
B 4 g Takaphosphatase „ 200 „ H_2O .

I. Lösung A . . . 180 ccm II. Lösung A . . . 20 ccm

„ B . . . 180 „ Wasser 20 „

$p_H = 7,2$.

Gesamt-Phosphat-bestimmung: 10,0 ccm von Lösung I verascht, Molybdän- und Magnesia-fällung, 3,674 mg P_2O_5 in 1 ccm.

Tabelle V zeigt die zunehmende Phosphatabspaltung.

Tabelle V. Gesamtphosphatgehalt: 3,674 mg P_2O_5 in 1 ccm.

Zeit	Aus 1 ccm Lösung abgespaltene Menge P_2O_5 in mg		Hydrolysen in %	
	I	II	I	II
Anfangs	0,517*	0,053	—	—
Nach 8 Stunden	1,760	—	39,4	—
„ 1 Tag	2,296	—	56,4	—
„ 3 Tagen	3,034	0,053	79,7	—

* Der Wert enthält das Phosphat aus dem Fermentmaterial.

Isolierung des Borneols wie vorher.

Fraktion I. Nach 8 Stunden (Spaltung 39,4 %) 0,856 g. Schmelzpunkt = 203°. $[\alpha]_D = -8,43^\circ$ ($\alpha = -0,69^\circ$, $l = 2$, $c = 4,09$).

Fraktion II. Nach 3 Tagen (Spaltung 79,7%) 0,893 g. Schmelzpunkt = 204°. $[\alpha]_D = + 7,07^\circ$ ($\alpha = + 0,58^\circ$, $l = 2$, $c = 4,10$).

Nach der Anfangs-Phosphat-bestimmung sind vorhanden 3,748 g Säure in 360 ccm. Daraus können bei einer Spaltung von 79,7% 1,961 g Borneol frei werden; isoliert wurden 1,749 g = 89,2%.

Ansatz VI.

Nimmt man das Borneol nicht aus der Reaktionsflüssigkeit heraus, sondern läßt die Spaltung bis zum Ende fortschreiten, so erhält man, wie zu erwarten war, ein Borneol, dessen Drehung nicht verschieden ist von der des angewendeten Borneols. Wir untersuchten diesen Fall an einer d, l-Borneol-phosphorsäure, die aus einem Borneol von der Drehung $[\alpha]_D = + 4,76^\circ$ hergestellt war und die spezifische Drehung = $+ 2,66^\circ$ besaß.

Stammlösungen: A 4 g Säure als Kaliumsalz in 200 ccm H_2O ,
B 2 g Takaphosphatase „ 200 „ H_2O .

I. Lösung A . . . 150 ccm II. Lösung A . . . 50 ccm
„ B . . . 150 „ Wasser . . . 50 „

Nach 5 Tagen war die Spaltung mit der großen Fermentmenge annähernd quantitativ.

Es wurden 1,802 g Borneol isoliert, die Drehung war $[\alpha]_D = + 4,66^\circ$ ($\alpha = + 0,58^\circ$, $l = 2$, $c = 6,224$), also identisch mit der Drehung des Ausgangsborneols.

Ansatz VII.

Ein gleicher Versuch mit vollkommen inaktivem bornyl-phosphorsauren Kalium lieferte nach viertägiger phosphatatischer Spaltung ein ganz inaktives Borneol. In diesem Verhalten liegt zudem noch ein Beweis dafür, daß die als Ausgangsmaterial benutzten entgegengesetzt drehenden Borneole wahre optische Antipoden gewesen sind.

Beiträge zur Messung des kolloid-osmotischen Druckes in biologischen Flüssigkeiten.

Von

August Krogh und Fusakichi Nakazawa.

(Aus dem Zoophysiologischen Laboratorium der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 1. Juli 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Seitdem *Starling* (1) schon im Jahre 1896 gezeigt hatte, daß die Kolloide (d. h. die Proteinstoffe) des Blutes einen gut meßbaren osmotischen Druck ausüben, der für die Funktionen des Blutes im Organismus von ausschlaggebender Bedeutung ist, ist eine nähere Erforschung dieses wichtigen Gebietes sehr lange unterblieben. Zwar sind von theoretischer Seite aus eine Reihe von Untersuchungen angestellt worden, um den osmotischen Druck von einzelnen wohldefinierten Kolloiden zu bestimmen und die komplizierte Abhängigkeit von Faktoren wie H-Ionenkonzentration, Kristalloiden usw. zu ermitteln [*Sørensen* (2), *Loeb* (3), *Adair* (4) und *Bjerrum* (5)]; allein das Studium des aktuellen kolloid-osmotischen Druckes von physiologischen und pathologischen Flüssigkeiten des Organismus ist erst in den allerletzten Jahren einem erhöhten Interesse seitens der Physiologen und Kliniker begegnet.

Seit 1922 ist nun eine Anzahl von Arbeiten erschienen, die sich mit dem kolloid-osmotischen Druck von Blut und Harn sowie normalen und pathologischen Gewebsflüssigkeiten befassen, sowohl vom physiologischen als auch vom klinischen Standpunkt aus [*Krogh* (6), *Hagedorn*, *Rehberg* und *Rasmussen* (1)¹, *Govaert* (7), *Sen* (8), *Schade* und *Clausen* (9), *Rusznayak* (10), *Dieter* (11), *Mayrs* (12), *Iversen* und *Nakazawa* (13)].

Die von diesen Autoren angewandten Methoden sind voneinander ziemlich verschieden und benötigen zum Teil recht große Flüssigkeits-

¹ Die für die klinische Verwertung kolloid-osmotischer Bestimmungen grundlegenden Untersuchungen über Nephrose von *Hagedorn*, *Rehberg* und *Rasmussen* wurden während meines Aufenthalts in Amerika ausgeführt, die Ergebnisse leider nur in Form einer Fußnote in meinem Kapillarbuch publiziert. Gleich nach meiner Rückkehr wurde die Arbeitskraft aller Beteiligten durch Insulinherstellung derart in Anspruch genommen, daß eine Fortsetzung unterbleiben mußte. *Krogh*.

mengen. Es scheint uns daher angebracht, unsere einfachen und möglichst exakten Mikromethoden genauer zu beschreiben, sowie unsere Untersuchungen über die methodisch wichtigen Einflüsse von Temperatur, p_H und Konzentration der untersuchten Kolloide zu veröffentlichen.

Krogh (6) hat bereits eine kurze Beschreibung der bisher im zoo-physiologischen Laboratorium angewandten Methode gegeben. Diese ist später vereinfacht und verbessert worden; da ihr jedoch, besonders für klinische Zwecke, einige Übelstände anhafteten, haben wir eine zweite Methode ausgearbeitet. Die ursprüngliche (erste) Methode arbeitet mit selbsthergestellten, schlauchförmigen Membranen, während man bei der neuen (zweiten) Methode im Handel käufliche flache Membranen benutzt. Für einige Zwecke ist aber dennoch das erste Verfahren vorzuziehen, wir wollen daher auch zuerst dieses ausführlich beschreiben.

Die erste Methode.

Diese Methode gründet sich auf *Sørensens* (2) Messungen des osmotischen Druckes reiner Eiweißkörper, aber die Dimensionen unserer Osmometer sind viel kleiner als die bisher benutzten, um die Messung des kolloid-osmotischen Druckes kleiner Mengen von Blut und von verschiedenen Gewebsflüssigkeiten vorzunehmen. Der schwierigste Punkt ist die Darstellung der semipermeablen Kollodiumröhre, mit deren Beschreibung wir zunächst beginnen.

Das Prinzip der Darstellung beruht darauf, daß die Kollodiumröhre über einer kapillaren Glasröhre, deren äußerer Diameter ein wenig schmaler als derjenige der kapillaren Glasröhre des Osmometers ist, in folgender Weise geformt wird. Man taucht die Glasröhre in eine Lösung von Kollodium in Ätheralkohol, läßt die anhaftende Schicht einige Zeit an der Luft trocknen und entfernt dann den noch im Kollodium gelösten Alkohol, indem man die Röhre ins Wasser taucht, worauf sich die Kollodiumröhre vom Glase abziehen läßt.

Krogh hat früher 8%ige Kollodiumlösungen in drei verschiedenen Alkohol-Äthergemischen angegeben, um dadurch eine Reihe von Abstufungen in der Permeabilität der Membranen zu erzielen. Es bestand die Absicht, die Kolloide in verschiedene Fraktionen zu zerlegen und die durch kleinere und größere Kolloidteilchen ausgeübten Druckwirkungen gesondert zu bestimmen. Nach sehr vielen Versuchen hat es sich herausgestellt, daß diese Aufgabe vorerst nicht zu lösen ist. Es läßt sich zwar zeigen, daß die Kolloidteilchen verschiedene Größe und osmotische Wirksamkeit besitzen, aber Membranen, die konstant für bestimmte Kolloidfraktionen gerade durchlässig sind, konnten bisher nicht hergestellt werden.

Wir verwenden daher jetzt nur noch Membranen, die für die untersuchten Kolloide eben undurchlässig sind, und solche lassen sich aus unserer Mischung B mit gleichen Volumenteilen Äther und Alkohol bequem herstellen¹. Die Durchlässigkeit ist fernerhin innerhalb ziemlich weiter Grenzen abhängig von der Dauer des Lufttrocknens vor dem Eintauchen ins Wasser; je mehr Alkohol das Kollodium im Augenblick des Eintauchens enthält, um so durchlässiger wird es. Die für gewöhnlich ausreichende Trockenzeit bei 20° beträgt 4 Minuten, für besonders kleine Partikelchen, wie sie mitunter im Harn vorkommen, ist eine längere Trocknungsdauer (6 bis 8 Minuten) erforderlich. Im folgenden werden die Röhrchen durch den Buchstaben *B* (oder *C*) und die Trockendauer bezeichnet.

Wir beschreiben nun genauer die *Darstellung* der *B4*-Röhren als Beispiel.

Die kapillare Glasröhre, über der die Kollodiumröhre angefertigt werden soll, hat einen äußeren Durchmesser von 4 mm mit etwa $\frac{1}{2}$ mm lichter Weite. Das Ende wird sorgfältig rund abgeschliffen, so daß die Lichtung bis auf die Spitze dieselbe Weite behält. Die Röhre wird mit Quecksilber genau bis in die Spitze gefüllt, damit ein Hineindringen des Kollodiums in die kapillare Röhre verhindert wird und später durch den Druck des Quecksilbers die anhaftende Kollodiumröhre leicht abgezogen werden kann. Um die Kollodiumröhre anzufertigen, tauchen wir zuerst die abgerundete Spitze der Glasröhre zweimal mit einem Zeitintervall von 1 Minute in die Kollodiumlösung und lassen sie einige Minuten in der Luft hängen, so daß sich eine ganz feste und undurchlässige Kappe bildet. Dann halten wir die Röhre senkrecht, tauchen sie in die Lösung 30 bis 35 mm tief ein, ziehen sie sofort ganz langsam und vorsichtig heraus, halten sie dann horizontal und drehen sie eine halbe Minute lang in der Luft um, um das Kollodium möglichst gleichmäßig zu verteilen. Nach einer halben Minute tauchen wir sie nochmals in die Lösung ein und verfahren in gleicher Weise wie das erste Mal. Nach dem zweiten Eintauchen trocknen wir unter ständiger Umdrehung $3\frac{1}{2}$ Minute bei 20°. Genau nach dieser Zeit tauchen wir die Glasröhre ins Wasser ein, um das Kollodium durch Entfernung des Alkohols zur Gerinnung zu bringen, lassen sie etwa 5 Minuten lang im Wasser stehen, schneiden dann das obere Ende der gebildeten Kollodiumröhre, die an der Glasröhre festklebt, bis auf die gewünschte Länge ab und ziehen sie von der Glasröhre mit Hilfe des Druckes des Quecksilbers ab.

Prüfung der Kollodiumröhre. Es muß festgestellt werden, ob die Röhren absolut undurchlässig für die zu untersuchenden Kolloide sind oder nicht.

Zu diesem Zwecke haben wir jedesmal den osmotischen Druck der betreffenden Kolloide (Serum, Harn) mit der frisch hergestellten Kollodiumröhre gemessen; nach der Messung wurde in der Außen-

¹ Die Mischung C, die für Versuche in dieser Abhandlung auch benutzt worden ist, enthält 20 Volumina Alkohol auf 80 Teile Äther.

flüssigkeit mit *Spiegler's*¹ Reagens ermittelt, ob Eiweiß durch die Röhre hindurchgegangen war oder nicht. Ferner wurden die Röhren geprüft durch die Messung ihrer Permeabilität für Wasser, da sich, je kleiner die Permeabilität ist, das Gleichgewicht desto langsamer einstellt. Die beste Kollodiumröhre ist absolut undurchlässig für die betreffenden Kolloide und möglichst durchlässig für Wasser, wodurch erreicht wird, daß sich der richtige Druck schneller einstellt.

Die Wasserpermeabilität wird nach *Zsigmondy* (14) durch diejenige Zeit bestimmt, die 100 ccm Wasser brauchen, um durch 100 qcm Filterfläche bei 1 Atm. Druckdifferenz zu filtrieren².

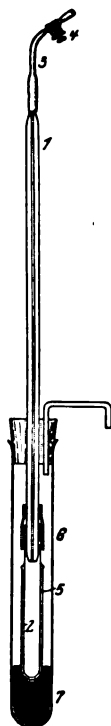


Abb. 1.
Osmometer I,
etwa
 $\frac{1}{2}$ nat.
Größe.

Die Bestimmung erfolgt derart, daß man die Röhre unter Wasser an einer 200 bis 400 mm langen Glasröhre von genau bestimmter lichter Weite (am bequemsten 1,5 bis 2 mm) befestigt. Das Ganze wird senkrecht aufgestellt mit der Kollodiumröhre unter Wasser, und man liest nun ab, wieviel Wasser innerhalb bestimmter Zeit aus der Röhre filtriert.

Unsere Kollodiumröhrchen haben mit einer zylindrischen Länge von 32 mm eine filtrierende Fläche von 4 qcm. Bei 300 mm Wasserdruck filtriert durch eine gute B 4-Membran etwa 1 cmm pro Minute, was einer Minutenzahl von 120 entspricht. Röhrchen mit Minutenzahlen von 200 sind für Serum noch gut brauchbar, für Harn kann sich die Notwendigkeit ergeben, noch viel dichtere Membranen zu benutzen.

Die geprüften Röhrchen dürfen nie trocken werden; man hebt sie am besten in 0,25‰iger Trypaflavin-Ringerlösung auf, wobei sie durch Adsorption des Trypaflavins einen gelben Farbenton annehmen. Ein gutes Röhrchen kann für viele Bestimmungen monatelang verwendet werden.

Die Ausführung der osmotrischen Bestimmung.

(1) (Abb. 1) ist eine kapillare Glasröhre von etwa 15 cm Länge und etwa $\frac{1}{2}$ mm lichter Weite. Sie ist unten ein wenig ausgezogen und mittels eines kurzen Gummischlauchs mit der Kollodiumröhre (2) verbunden. Diese Kollodiumröhre und die Glasröhre werden mit dem zu

¹ *Spiegler's* Reagens: 4 g Sublimat, 2 g Weinsäure, 10 g Glycerin, 100 g Aqua dest.

² *Krogh* hat bisher seine Osmometermembranen durch diejenige Wassermenge charakterisiert, die in 1 Minute bei 1 Atm. Druck durch 100 qcm fließt. Im Interesse der Einheitlichkeit sollen jetzt ausschließlich *Zsigmondysche* Bezeichnungen benutzt werden.

untersuchenden Material (Blut, Harn usw.) gefüllt bis nahe dem oberen Ende von (1). (3) ist ein Stück engen Gummischlauchs, der durch die Klemme (4) geschlossen ist. Die Außenflüssigkeit — gewöhnlich Ringerlösung für Blutserum, Ultrafiltrat für Harn und für andere Kolloide — wird in eine Glasröhre von 4,5 mm lichter Weite und etwa 30 mm Länge (5) gebracht, in die aber keine Luftblasen und keine Spur von der zu untersuchenden Flüssigkeit geraten dürfen. Das Ganze wird in einem kleinen Reagenzglaschen (6) befestigt, das etwas Quecksilber (7) enthält, um die Röhre (5) zu heben und sie in einer bestimmten Lage zur Kollodiumröhre (2) zu halten.

Es ist von großer Wichtigkeit, daß die Röhre (5) während des ganzen Versuchs vollkommen gefüllt bleibt. Bildet sich hier, infolge Verdunstung, im engen Raume ein hohler Meniskus aus, so werden die Druckresultate ganz gefälscht. Um jeder Verdunstung vorzubeugen, wird daher etwas Wasser auf das Quecksilber gegossen, und gewöhnlich setzen wir noch ein Filtrierpapierstreifen an die Innenwand von (6) ein.

Die Röhre (5) wird deshalb sehr eng gewählt, weil bei möglichst kleiner Außenflüssigkeitsmenge der Ausgleich der diffusiblen Stoffe am schnellsten erfolgt. Wir benötigen für eine Bestimmung 0,3 bis 0,4 ccm Innen- und etwa 0,1 ccm Außenflüssigkeit. Dabei hat die Kollodiumröhre eine effektive Oberfläche von 3 bis 4 qcm¹.

Die gefüllten Osmometer werden in ein Wasserbad eingehängt, in der Regel bei Zimmertemperatur.

Wenn die Klemme (4) geschlossen bleibt, findet ein Austausch von Wasser und dialysablen Substanzen durch die Kollodiumröhre hindurch statt. Der Meniskus steigt in (1), die Luft darüber wird komprimiert, bis zwischen dem osmotischen Druck und dem Filtrationsdruck Gleichgewicht hergestellt ist. Das Gleichgewicht wird mit Serum gewöhnlich in 4 bis 6 Stunden erreicht, aber je kleiner die Permeabilität der Membranen ist, desto langsamer stellt sich natürlich das Gleichgewicht ein.

Zur Druckmessung benutzt man ein horizontales, in der Höhe verstellbares Ablesemikroskop mit einer Klemme zur Befestigung des Osmometers und stellt auf den Meniskus ein. An der Seite des Wasser-

¹ Oft wird für osmometrische Bestimmungen an Blut usw. eine derart große Menge Außenflüssigkeit benutzt, daß diese praktisch unverändert bleibt. Das Gleichgewicht muß sich auf Kosten des Blutes einstellen, das alle diffusiblen Stoffe abgeben muß. Wir halten ein solches Verfahren für sehr bedenklich. Unserer Meinung nach soll man die Zusammensetzung des Blutes möglichst wenig beeinflussen; überdies diffundieren wahrscheinlich einige Blutkristalloide so langsam, daß ein Gleichgewicht vorgetäuscht werden kann, das nicht wirklich erreicht ist.

bades steht ein Druckapparat, bestehend aus zwei kleinen, durch Gummischlauch verbundenen Glasbehältern, die teilweise mit Wasser gefüllt sind. Der eine fest aufgestellte wird durch Gummischlauch (1 mm lichter Weite) und Glasröhrchen mit dem Osmometer bei (3) verbunden. Der andere kann zum Einstellen eines beliebigen Druckes einer vertikalen Millimeterskala entlang verschoben werden. Nach Verbindung mit dem Osmometer stellt man den Druck ungefähr auf den erwarteten ein, öffnet die Klemme (4) und beobachtet, wie sich der Meniskus in (1) bewegt. Der Druck wird so lange geändert, bis der Meniskus wenigstens einige Minuten stationär bleibt. Die Ablesung am Druckapparat gibt dann mit den nötigen Korrekturen für die Höhe der Flüssigkeit sowie für deren Kapillarität in der Röhre (1) den Druck an.

Als Beispiel geben wir zwei Parallelbestimmungen an Pferdeserum.

Um 12 Uhr Osmometer eingehängt Erste Ablesung um 5 Uhr.

Osmometer I		Osmometer II	
Druck mm	Meniskus	Druck mm	Meniskus
200	sinkt schnell	160	steigt sehr langsam
150	steigt	170	sinkt "
165	sinkt sehr langsam	165	steht still "
160	steht still		

Die abgelesenen Druckwerte bedürfen gewisser Korrekturen für den Druck der Flüssigkeitssäule in der Röhre (1). Die Länge dieser Röhre wird für jedes Osmometer gemessen, und die Höhe, bis zu der die untersuchte Flüssigkeit infolge ihrer Kapillarität aufsteigt, in Abzug gebracht. Die kapillare Steighöhe ist für verschiedene Eiweißkonzentrationen nicht die gleiche und muß daher für jede zur Untersuchung kommende Flüssigkeit und für jede Röhre besonders bestimmt werden. Nach der Druckablesung wird dann noch die flüssigkeitsfreie Länge der Röhre mit Hilfe eines kleinen Maßstabs gemessen und ebenfalls in Abzug gebracht. Bei sehr genauen Arbeiten muß noch berücksichtigt werden, daß das spezifische Gewicht der Flüssigkeit in der Röhre (1) etwas höher als 1 ist. Für Serum etwa 1,02 bis 1,03.

Im gegebenen Beispiel haben wir:

Länge I.	145 mm	Länge II	142 mm
Kapillarität . .	33 „		33 „
Flüssigkeitsfrei .	10 „		14 mm
Druckwirkung .	102 mm ($\times 1,02 = 104$)		95 „ ($\times 1,02 = 97$)
Abgelesen . . .	160 „		165 „
Osm. Druck . .	262 mm (264)		260 mm (262)

Gewöhnlich nimmt man nach 16 bis 24 Stunden eine zweite Ablesung vor, die dann mit der ersten innerhalb 10 mm übereinstimmen soll. Ist das nicht der Fall, so liest man nach weiteren 4 bis 6 Stunden nochmals ab. Wenn die Druckwerte dabei ständig abfallen, ist wahrscheinlich Infektion eingetreten. Bei genügender Übereinstimmung nimmt man das Mittel der übereinstimmenden Ablesungen. Die Einstellung kann, wenn es wünschenswert ist, mit einer Genauigkeit von 1 bis 2 mm erfolgen; für gewöhnlich lassen sich jedoch die Resultate nicht mit so großer Genauigkeit reproduzieren, zum größten Teile wohl infolge Unsicherheiten in den Kapillarwirkungen an den freien Oberflächen der Innen- und Außenflüssigkeiten. Die absolute erreichbare Genauigkeit läßt sich mit ungefähr 10 mm Wasserdruck bemessen.

Nach der osmometrischen Bestimmung wird der Apparat auseinandergenommen. Die Kollodiumröhre (2) und Glasröhre (5) werden sorgfältig mit fließendem Wasser ausgespült und in Trypaflavin-Ringerlösung aufgehoben. Die Röhre (1) wird nach der Spülung noch mit Bichromatschwefelsäure gereinigt. Man hebt sie am besten in diesem Gemisch auf und spült sie unmittelbar vor dem Wiedergebrauch mit sterilem Wasser ab. Es ist sehr wichtig, daß die Apparatur steril ist und daß außerdem die Röhre (1) überall von der Flüssigkeit vollkommen benetzt wird.

Die zweite Methode.

Besonders für klinische Zwecke, bei denen die Herstellung der Kollodiumröhrchen Schwierigkeiten bereiten würde, haben wir einen Apparat aus Hartgummi und Glas, wie es die Abb. 2 zeigt, konstruiert, der mit käuflichen, flachen Membranen arbeitet. Der Hartgummiklotz (3) wird mit der großen Öffnung nach oben aufgestellt. Auf dem Gummiring (7) wird die Membran (von 19 mm Durchmesser) angebracht. Auf diesen kommt eine mit Trypaflavin-Ringerlösung (oder Ultrafiltrat) durchtränkte Filtrierpapierscheibe und auf diese wieder eine durchlöcherichte Silberplatte (4). Der Trichter (6) wird schließlich aufgesetzt und das Ganze mittels der Schraube (5) zusammengeschraubt. Nach Umkehrung wird die zu untersuchende Flüssigkeit in passender Menge (etwa 0,5 ccm) eingefüllt. Die Glasröhre (1) wird vorsichtig eingeführt, bis die Flüssigkeit in die Kapillare aufsteigt, indem man darauf achtet, daß keine Luftblasen zurückbleiben. Schließlich wird

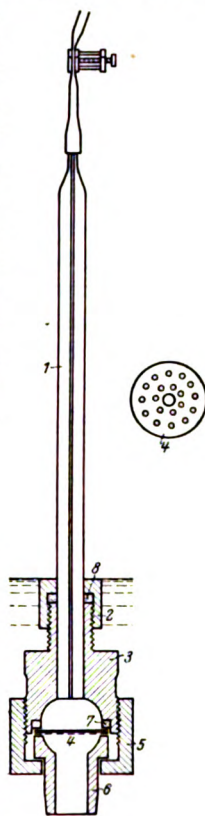


Abb. 2.
Osmometer II,
1/2 nat. Größe.

durch Anziehen der Schraubenmutter (2) die Röhre (1) durch die Gummidichtung (8) festgeklemmt und gleichzeitig die Flüssigkeit in der Kapillare hochgetrieben.

Als Membranen verwenden wir die von Dr. *E. Kratz*, Göttingen, zu beziehenden Ultrafilter, und zwar besonders solche mit Minutenzahlen von 70 bis 200, die für Proteinstoffe undurchlässig sind. Wir haben unsere Membranen und Papierscheiben vermittelst Korkbohrers aus größeren Filtern selbst ausgebohrt. Es ist natürlich bequemer, dieselben gebrauchsfertig zu beziehen.

Das Verfahren gestaltet sich übrigens wie mit Osmometer 1. Die Apparate werden in ein Wasserbad eingehängt. Für langdauernde Versuche ist es wegen der winzigen Menge Außenflüssigkeit prinzipiell richtig, das Bad mit 1%iger Salzlösung zu beschicken, damit kein Wasser aus dem Bade in die Außenflüssigkeit übergeht.

Die kleine Menge Außenflüssigkeit bringt es auch mit sich, daß man bei der Einstellung des Druckes so verfahren muß, daß man zuerst einen zu hohen Druck einstellt und dann den kleinsten Druck ermittelt, bei dem gerade noch Filtration stattfindet. Wenn der Druck zu niedrig eingestellt wird, so bekommt man nicht, wie beim ersten Osmometer, einen regelmäßigen Anstieg der Flüssigkeit in der Röhre (1), sondern entweder Stillstand oder unregelmäßige, plötzliche Bewegungen.

Bei der Berechnung des osmotischen Druckes aus der Ablesung am Druckapparat haben wir dieselben Korrekturen zu berücksichtigen wie beim ersten Verfahren und überdies noch den Gegendruck, der davon herrührt, daß der Apparat während der Bestimmung mehr oder weniger tief ins Wasser taucht.

Im einzelnen verfährt man so, daß man die Gesamtlänge des gefüllten Apparats in Millimetern mißt. Von dieser Länge subtrahiert man die Länge des Trichters (6) (21 mm) und die Kapillarwirkung der untersuchten Flüssigkeit in der Röhre (1) und bekommt eine Zahl, die zu den abgelesenen hinzuaddiert werden muß. Bei der Ablesung notiert man ferner die flüssigkeitsfreie Länge der Röhre (1) und die Eintauchtiefe vom Wasserspiegel bis an das untere Ende des Trichters (6). Diese beiden Größen müssen vom gefundenen Resultat abgezogen werden.

Bei der Reinigung verfährt man wie beim ersten Apparat. Nur müssen die Hartgummitteile nach der Reinigung mit Wasser noch mit Alkohol gespült werden; sie werden dann zweckmäßig im Trockenschrank bei etwa 60° getrocknet.

In Tabelle I haben wir eine Reihe von Bestimmungen des osmotischen Druckes von einem Standard-Pferdeserum mit beiden Verfahren und mit Membranen von verschiedener Wasserpermeabilität wiedergegeben. Das steril entnommene Serum wurde uns vom Statens Serum-

institut (Direktor Dr. Th. Madsen) in Ampullen und Flaschen zur Verfügung gestellt und hat sich zu Kontrollzwecken und zur Lösung einer Reihe unserer Aufgaben ausgezeichnet bewährt. Wir sprechen auch hier dem Institut und besonders dem Abteilungsvorsteher, Herrn Dr. E. Walbum, unseren aufrichtigen Dank aus.

Tabelle I.

Messungen des kolloid-osmotischen Druckes von Standard-Pferdeserum.

Erstes Verfahren		Zweites Verfahren	
Minutenzahl der Kollodiumröhre B 4	Druck	Minutenzahl der Membranen	Druck
260	266	170	271
	262	—	260
210	271	—	255
	264	—	268
170	259	70	274
	267	—	254
130	260	—	263
	267	—	258
Durchschn.	264,5	Durchschn.	263
		35	247
		—	262
		—	243
		—	237
		Durchschn.	247
		22	252
		—	230
		—	244
		—	237
		Durchschn.	241
		5	220
		—	231
		—	237
		—	221
		Durchschn.	227

Die Tabelle zeigt, daß die beiden Verfahren denselben Wert ergeben für den Druck der Kolloide, wenn nur die Membranen genügend dicht sind. Das erste Verfahren besitzt eine etwas größere Genauigkeit. Der mittlere Fehler (Dispersion) der einzelnen Bestimmungen ist für Methode 1 $\pm 4,1$ mm Druck, für Methode 2 $\pm 7,5$ mm Wasserdruk.

Im folgenden geben wir das Resultat einiger Untersuchungen von wesentlich methodischem Charakter, die mit den zwei beschriebenen Osmometern angestellt sind. Unser Hauptzweck war, die experimentellen Bedingungen festzustellen, die man innehalten muß, um in der Physiologie und Klinik brauchbare Resultate zu erhalten.

Einfluß der Temperatur auf den kolloid-osmotischen Druck.

Bisher wurde im hiesigen Laboratorium streng daran festgehalten, daß Bestimmungen des kolloid-osmotischen Druckes bei Körpertemperatur zu geschehen hatten, weil zu befürchten war, daß sich der Aggregatzustand der Eiweißkörper mit der Temperatur ändern könnte. Von anderen Forschern sind aber die Bestimmungen vielfach bei Zimmertemperatur ausgeführt worden, was natürlich viel bequemer ist und auch die Infektionsgefahr wesentlich herabsetzt. Die Resultate schienen nicht wesentlich durch die niedrige Temperatur beeinflußt zu werden. Wir haben jetzt eine Reihe vergleichender Versuche an Pferdeserum und Menschen Serum bei 37°, 16 bis 17°, 0 bis 3° angestellt, die auszugsweise in Tabelle II wiedergegeben sind. Die Druckwerte scheinen mit der Temperatur ein wenig anzusteigen. Der Unterschied ist aber bedeutungslos.

*Tabelle II.***A. Menschen Serum, nach dem ersten Verfahren bestimmt.**

Merkmal des Serums	Kolloid-osmotischer Druck in mm H ₂ O im Wasserbad (16°) Probe 1	Kolloid-osmotischer Druck in mm H ₂ O im Wasserbad (37°) Probe 2
Anämisches Serum	277	281
Eiweiß 6,34 %	276	279
Normales Serum	379	381
Eiweiß 8,20 %	390	391
	Durchschn.: 330,5	Durchschn.: 333

B. Pferdeserum, nach dem zweiten Verfahren bestimmt.

Minutenzahl der Membran	Kolloid-osmotischer Druck in mm H ₂ O im Wasserbad (17°) Probe 1	Kolloid-osmotischer Druck in mm H ₂ O im Eiswasserbad (0 bis 3°) Probe 2
70	263	241
70	257	239
70	256	237
70	261	240
70	248	240
	Durchschn.: 257	Durchschn.: 239
170	262	264
170	263	261
170	274	265
170	269	272
170	258	259
	Durchschn.: 265	Durchschn.: 264

Einfluß der Reaktion und Salzkonzentration.

Reaktionsänderungen haben wir in einer Versuchsreihe dadurch hervorgerufen, daß wir unser Standard-Pferdeserum mit abgemessenen Mengen von HCl oder NaOH versetzten sowie in den Versuchen nach unserem ersten Verfahren den kolloid-osmotischen Druck solcher Mischungen mit dem entsprechenden Druck nach einfachem Wasserzusatz verglichen. In der Außenflüssigkeit wurde dann das p_H nach der Mikromethode von *Lindhard* (15) kolorimetrisch bestimmt. Die Tabelle III zeigt an, daß von p_H 7 bis 8 die Wasserstoffionenkonzentration auf den gemessenen Druck überhaupt keinen Einfluß ausübt. Bei saurer Reaktion sinkt der Druck allmählich.

Tabelle III.

Pferdeserum ccm	Zugesetzte Flüssigkeit	p_H	Kolloid-osmotischer Druck in mm Wasser
2	0,2 ccm n HCl	< 4,5	119 122
2	0,2 „ n/2 HCl	< 4,5	122 127
2	0,2 „ n 5 HCl	6,3	177 179
2	0,2 „ n/10 HCl	7,0	196 202
2	0,2 „ Wasser	7,4	193 205
2	0,2 „ n/50 NaOH	7,6	198 198
2	0,2 „ n/20 NaOH	7,9	189 200
2	0,2 „ n/10 NaOH	> 8,0	198 199

Serumeiweißgehalt verdünnt zu 5,9%.

Da die Möglichkeit nicht ganz von der Hand zu weisen war, daß die Kohlensäure einen spezifischen Einfluß auf den Aggregatzustand der Kolloide ausüben könnte, haben wir weiter mit Hilfe unseres zweiten Verfahrens diese Frage so zu lösen gesucht, daß wir durch den Raum (4) im Osmometer während der Bestimmung einen Gasstrom mit bestimmtem CO_2 -Gehalt geleitet haben. Die Kohlensäure diffundiert dann in die Flüssigkeiten hinein, und ein Gleichgewicht stellt sich jedenfalls nach einigen Stunden sehr vollkommen ein. Dasselbe Osmometer wurde abwechselnd teils mit reiner atmosphärischer Luft, teils mit 5% und teils mit 100% CO_2 behandelt. Zwischen der Wirkung von Luft und 5% CO_2 konnte überhaupt kein Unterschied wahr-

genommen werden. Reine Kohlensäure ergab, der Säurewirkung entsprechend ($p_H = 6,6$), eine geringe Erniedrigung des Druckes.

Aus diesen Versuchen geht demnach hervor, wie schon von *Mayrs* (12) gefunden worden war, daß es nicht notwendig ist, bei Bestimmungen des kolloid-osmotischen Druckes von biologischen Flüssigkeiten, die ja immer eine gewisse Pufferwirkung zeigen, besondere Vorsichtsmaßregeln zur Konstanthaltung des p_H zu beobachten.

Auch in bezug auf den Einfluß der Salzkonzentration können wir die Resultate von *Mayrs* (12) bestätigen. Innerhalb des von uns untersuchten Gebiets von etwa 0,3 bis 1,5 % Salz hat die Konzentration, wie aus der Tabelle IV ersichtlich, keinen meßbaren Einfluß.

Tabelle IV.

Pferde- serum	Verdünnungsmittel	Eiweißgehalt in Gemischen	Kolloid- osmotischer Druck in mm H ₂ O in mm Wasser	Kolloid- osmotischer Druck in mm H ₂ O für 1 % Eiweiß
ccm		%		
1	2 ccm H ₂ O	2,23	52,0	23,3
1	2 „ 0,9% iges NaCl	2,23	49,3	22,0
1	2 „ 1,8% iges NaCl	2,23	49,7	22,2

Einfluß der Kolloidkonzentration.

Nach den im vorhergehenden beschriebenen Resultaten darf angenommen werden, daß wir in einem Konzentrationsbereich arbeiten, in welchem Donnanefekte sich nicht bemerkbar machen können, und es wäre dann zu erwarten, daß der osmotische Druck der Kolloide einfach proportional ihrer Konzentration variieren müßte. Dies ist aber nicht der Fall. Wie schon *Mayrs* (12) und *Verney* (16) gefunden haben, nimmt bei der Verdünnung von Serum der Druck stärker ab, als es der Konzentrationsänderung entspricht, und wir können diese Resultate vollauf bestätigen und erweitern. Wir haben Bestimmungen durchgeführt an Menschen-, Pferde- und Froschserum, verschiedenen eiweißhaltigen Menschenharnen und schließlich auch an einer Lösung von Gummiarabikum. Die ursprünglichen Flüssigkeiten wurden teils mit physiologischer Kochsalzlösung (bzw. Ultrafiltrat) verdünnt, teils durch Ultrafiltration mittels der eiweißdichten Ultrafilter nach *E. Kratz* eingedickt. Zur Bestimmung des Eiweißgehalts in allen verdünnten oder konzentrierten Flüssigkeiten bedienten wir uns des Eintauchrefraktometers nach *Pulfrich*.

Die Bestimmungen an Menschen- und Pferdeserum sind nach den beigegebenen Tabellen nach *Reiss* ausgeführt worden, und die Übereinstimmung zwischen den berechneten und refraktometrisch bestimmten Verdünnungen ist eine sehr gute.

Herr Dr. *Linderström-Lang* hatte die Freundlichkeit, an Froschserum eine Proteinbestimmung auszuführen, die 2,88 % ergab. Im Ultrafiltrat des betreffenden Serums haben wir einen Brechungsindex (n_D) von 1,334506 gefunden und einen Zuwachs für jedes Prozent Protein von 0,002310.

An den eiweißhaltigen Harnen haben wir jedesmal den Eiweißgehalt mit *Claudius'* Albuminimeter bestimmt und die Lichtbrechung sowohl des Harns wie des Ultrafiltrats gemessen. Nach unserer Er-

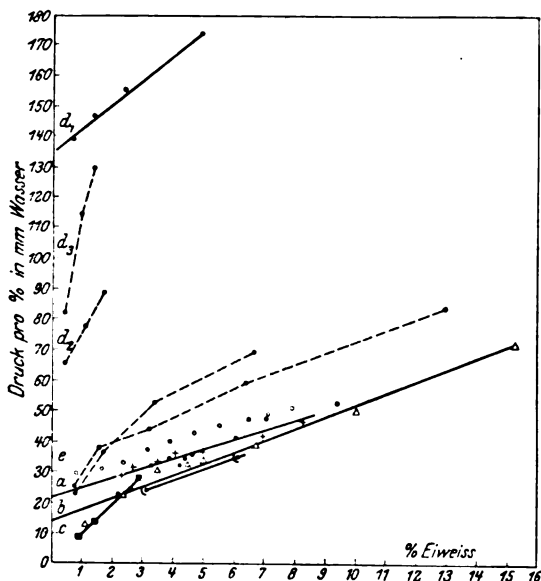


Abb. 3.

Kolloid-osmotischer Druck pro ‰ Eiweiß nach Tabelle V.

a Menschenserum. + unsere Bestimmungen, ○ Bestimmungen von *Mayrs*, ● Bestimmungen von *Verney*. b Standard-Pferdeserum. Δ unsere Bestimmungen. c Froschserum. □ unsere Bestimmungen. d 1–3 Menschenharn. e Hühnereiweiß. (· Bestimmungen an Gummilösungen.

fahrung ist der Brechungszuwachs für 1 % Harneiweiß sehr variabel. In einem Falle von Stauungsniere haben wir z. B. 0,004015 und in einem anderen von Glomerulonephritis 0,002908 gefunden.

Wie aus den Tabellen ersichtlich, haben wir weiter die Viskosität der untersuchten Flüssigkeiten und Verdünnungen (bzw. Konzentrationen) nach *Hess* bestimmt und jedesmal die Viskositätszunahme für 1 % Eiweiß berechnet. Die Zahlen haben uns keine Gesetzmäßigkeiten ergeben.

Unsere Resultate sind in der Tabelle Va bis f zusammengestellt und graphisch in Abb. 3 wiedergegeben. In Abb. 3 haben wir noch die Resultate von *Mayrs* (12) und *Verney* (16) an Menschenserum

Tabelle V.

Bestimmungen nach dem ersten Verfahren.

a) Menschenserum.

	Eiweißgehalt in ‰ nach der Verdün- nung berechnet	Kolloid-osmotischer Druck in mm Wasser	Kolloid-osmotischer Druck in mm H ₂ O für 1 ‰ Eiweiß
Fall 1. Unverdünnt . .	8,28	385	46,5
Verdünnt . . .	4,14	150	36,3
" . . .	2,76	80	29,0
Fall 2. Unverdünnt . .	6,98	295	42,4
Verdünnt . . .	3,49	114	32,7
" . . .	2,33	65	28,0

	Eiweißgehalt in ‰		Kolloid- osmo- tischer Druck in mm Wasser	Kolloid- osmo- tischer Druck in mm Wasser für 1 ‰ Eiweiß	Viskosi- tät	Viskosi- tats- zunahme für 1 ‰ Eiweiß	Bemerkungen
	Refrak- tometr. be- stimmt	berech- net					

b) Pferdeserum.

Unverdünnt	6,68	—	260	39,0	1,60	0,090	1. Viskos. d. Ultra- filtrate d. Serums ist 1,00. Also Viskositätszunahme = $\frac{\text{Viskosität} - 1,00}{\text{Eiweiß} \cdot 0,10}$
Eindickung	15,23	—	1080	71,0	3,39	0,156	
"	10,09	—	502	49,8	2,14	0,113	
Verdünnung	—	5,35	190	35,6	—	—	2. Verdünnungs- mittel 0,9 ‰ ige NaCl-Lösung 3. Die Druckwerte sind Mittel aus drei oder mehr Bestimmungen
"	5,00	5,01	177	35,3	1,43	0,086	
"	5,00	5,01	175	35,0	1,43	0,086	
"	4,46	4,45	147	33,0	1,37	0,086	
"	4,48	4,45	148	33,1	1,39	0,087	
"	3,34	3,34	105	31,5	1,31	0,093	
"	3,32	3,34	105	31,5	1,30	0,090	
"	2,24	2,23	51	22,6	1,21	0,094	
"	2,24	2,23	50	22,2	1,20	0,090	
"	1,11	1,11	14	12,6	1,12	0,105	

c) Froschserum.

Unverdünnt	2,88	—	79	27,4	1,48	0,166	1. Viskositätszu- nahme = $\frac{\text{Viskosität} - 1,0}{\text{Eiweiß} \cdot 0,10}$
Verdünnt	1,43	1,44	19	13,2	1,20	0,139	
"	0,95	0,96	8	8,4	1,15	0,158	
							2. Verdünnungs- mittel 0,65 ‰ ige NaCl-Lösung

Tabelle V (Fortsetzung).

	Eiweißgehalt in %		Kolloid- osmo- tischer Druck in mm Wasser	Kolloid- osmo- tischer Druck in mm Wasser für 1 % Eiweiß	Viskosi- tät	Viskosi- tats- zunahme für 1 % Eiweiß	Bemerkungen
	be- stimmt	berech- net					

d) Menschenharn.

Fall 1. Amyloid- niere.							1. Außenflüssigkeit u. Verdünnungs- mittel sind Ultra- filtrate
Unverdünnt	1,40	—	205	147,0	1,28	0,128	2. Viskosität der Ultrafiltrate der drei Harn = 1,10
Eindickung	4,90	—	855	174,3	2,30	0,245	
"	2,40	—	371	154,5	1,50	0,162	
Verdünnung	0,74	0,70	103	139,0	1,18	0,114	3. Viskositätszu- nahme = $\frac{\text{Viskosität} - 1,10}{\text{Eiweiß} \%}$
Fall 2. Glomerulo- neph.							
Unverdünnt	0,50	—	33	66,0	1,14	0,080	
Eindickung	1,15	—	91	78,1	1,19	0,080	
"	1,68	—	148	88,0	1,27	0,100	
Fall 3. Stauungs- niere.							
Unverdünnt	0,40	—	33	82,0	1,15	0,125	
Eindickung	1,00	—	114	114,0	1,20	0,100	
"	1,30	—	166	129,0	1,28	0,138	

e) Hühnereiweiß.

Ei 1.							1. Verdünnungs- u. Außenflüssigk. sind Ultrafiltrate
Unverdünnt	12,9	—	1078	83,5	3,45	0,19	2. Viskos. des Ultra- filtrats = 1,05 (beide Eier)
Verdünnt	6,4	6,4	382	59,7	1,93	0,14	
"	3,2	3,2	141	44,2	1,50	0,14	
"	1,6	1,6	62	38,7	1,26	0,13	3. Viskositäts- zunahme = $\frac{\text{Viskosität} - 1,05}{\text{Eiweiß} \%}$
"	0,8	0,8	20	25,0	1,15	0,12	
Ei 2.							
Doppelt verd.	6,6	6,6	457	69,4	2,10	0,16	
Weiter "	3,4	3,3	181	53,3	1,60	0,16	
" "	1,7	1,6	63	37,0	1,25	0,12	
" "	0,8	0,8	19	23,8	1,16	0,14	

f) Gummiarabikum.

Gummigehalt %	Kolloid-osmotischer Druck in mm Wasser	Kolloid-osmotischer Druck in mm Wasser für 1 % Gummi
3,0	74	24,7
3,0	71	23,7
6,0	213	35,5
6,0	210	35,0

eingezeichnet. *Verneys* Resultate stimmen mit den unsrigen ganz gut überein, während die von *Mayrs* durchgehend etwas höher liegen, aber sonst einen entsprechenden Verlauf der Verdünnungskurve anzeigen.

Verney (16) hat versucht, eine theoretische Ableitung seiner Resultate zu geben, indem er von der Tatsache ausgeht, daß die Kolloidpartikeln ein bedeutendes Volumen einnehmen müssen und deshalb eine einfache Proportionalität zwischen Konzentration und Druck nur nach Korrektur für dieses Volumen zu erwarten ist. Diese Annahme führt zu einer Gleichung $p(1/c - b) = k$, in welcher p = kolloid-osmotischer Druck der Lösung, c = Konzentration, k eine Konstante und b eine andere Konstante bedeutet, welche das effektive Volumen von allen Kolloidteilchen in der ursprünglichen Lösung (Menschenserum mit 1,12 % Proteinstickstoff = 7,02 % Protein) angibt. Graphisch findet man die Relation zwischen $1/p$ als Ordinate und dem reziproken Wert der Verdünnung als Abszisse als eine gerade Linie, die die Abszisse in b schneidet. *Verneys* Bestimmungen können ganz gut durch eine gerade Linie repräsentiert werden, die die Abszisse in einem Abstand von 50 % schneidet. Nach ihm soll also das effektive Volumen von 7,02 % Protein im Serum ungefähr 50 % des Serums ausmachen.

Unsere Resultate lassen sich, nach *Verneys* Formeln berechnet, nicht durch gerade Linien wiedergeben, aber es scheint uns besonders bedenklich, daß schon bei einer Eindickung zum halben Volumen, oder höchstens zu einem Drittel, das freie Wasser ganz verschwunden und der Druck auf unendlich gestiegen sein sollte. Jedenfalls gelingt es leicht, durch den Druck von 3 bis 4 Atmosphären weit mehr Ultrafiltrat abzapressen. Wir ziehen es deshalb vor, überhaupt keine theoretische Erklärung zu versuchen und unsere Resultate als rein empirische hinzustellen.

Tabelle VI.

	Kontrolle		Coffein	
	Normales Pferdeserum 4 ccm	0,9%ige NaCl-Lösung 1 ccm	Normales Pferdeserum 4 ccm	0,5%ige Coffeinelösung 1 ccm
	Kolloid-osmotischer Druck in mm H ₂ O		Kolloid-osmotischer Druck in mm H ₂ O	
Versuch 1	198		201	
" 2	181		196	
" 3	203		214	
" 4	198		196	
" 5	185		185	
" 6	189		172	
" 7	183		179	
" 8	183		178	
" 9	185		189	
	Durchschnitt: 189,4 ± 3,3		Durchschnitt: 190 ± 4,4	

Bei der Beurteilung von pathologischem Serum muß man, wie es auch *Mayrs* tut, zuerst den Druck pro Prozent Eiweiß berechnen und dann bestimmen, ob der Druck höher oder niedriger ist, als es einem Normalserum mit demselben Eiweißgehalt entspricht. Dies geschieht am einfachsten graphisch mittels der Kurve.

Die vermutete Wirkung des Coffeins auf den „Quellungsdruck“ von Serum.

Schließlich haben wir noch nach einer etwaigen Wirkung des Coffeins auf den osmotischen Druck der Serumproteine gefahndet. *Ellinger* und *Heymann* (17) haben in Perfusionsversuchen an Froschschenkeln gefunden, daß Coffeinzusatz zu proteinhaltigen Durchspülungsflüssigkeiten ödemverhindernd wirkt, und sie glauben, daß Coffein den „Quellungsdruck“ der gelösten Proteine erhöht. Zwar läßt sich der Begriff von einem vom osmotischen verschiedenen „Quellungsdruck“ bei gelösten Stoffen nicht aufrecht halten, aber es wäre immerhin doch möglich, daß Coffein eine Änderung des Aggregatzustandes der Proteine herbeiführen könnte. Unsere Versuche, die mit der von *Ellinger* und *Heymann* als wirksam befundenen Konzentration von 0,05 % Coffein angestellt worden sind, haben aber ein ganz negatives Resultat gegeben, wie aus Tabelle VI mit genügender Sicherheit hervorgeht, obwohl die Einzelresultate keine gute Übereinstimmung zeigen.

Zusammenfassung.

Es werden zwei Methoden zur Messung des kolloid-osmotischen Druckes von biologischen Flüssigkeiten beschrieben. Beide arbeiten mit Flüssigkeitsmengen von 0,3 bis 0,5 ccm, und besonders die zweite ist wegen ihrer Einfachheit für klinische Zwecke geeignet. Die Genauigkeit beträgt etwa 10 mm Wasserdruck.

Die Bestimmungen können ohne Fehler bei Zimmertemperatur ausgeführt werden. Die Salz- und Wasserstoffionenkonzentrationen haben innerhalb des Bereiches von $\frac{1}{2}$ bis $1\frac{1}{2}$ und p_H 7 bis 8 keinen Einfluß auf die Resultate. Bei niedrigerem p_H vermindert sich der Druck. Kohlensäure übt keinen spezifischen Einfluß auf den kolloid-osmotischen Druck aus.

Der kolloid-osmotische Druck der untersuchten Flüssigkeiten nimmt bei der Verdünnung nicht proportional der Kolloidkonzentration ab, sondern stärker. Die Kurven zeigen das Verhältnis zwischen Druck pro Prozent Eiweiß und Konzentration an. Diese Kurven sind praktisch geradlinig und können zur Beurteilung von pathologischen Seren benutzt werden.

Coffein übt keine Wirkung auf den kolloid-osmotischen Druck von Serum aus.

Literatur.

- 1) *Starling*, Journ. of Physiol. **19**, 312. — 2) *Sørensen*, C. r. Travaux Lab. Carlsberg **12**, 1915/17. — 3) *Loeb*, Proteins and the Theory of Colloidal Behavior. New York 1924. — 4) *Adair*, Proc. Roy. Soc. Amer. **109**, 292, 1925. — 5) *Bjerrum*, Zeitschr. f. physik. Chem. **110**, 656, 1924. — 6) *Krogh*, Anatomy and Physiology of Capillaries. New Haven 1922. Deutsche Ausgabe. Berlin 1924. — 7) *Govaerts*, Bull. Acad. Roy. Med. Belg. **4**, 161, 1924. — 8) *Serr*, Arch. f. Ophthalm. **114**, 393, 1924. — 9) *Schade und Clausen*, Zeitschr. f. klin. Med. **100**, 363, 1924; Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **49**, 334, 1926. — 10) *Rusznayak*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **41**, 532, 1924. — 11) *Dieter*, Arch. f. Augenheilkde. **96**, 179, 1925. — 12) *Mayrs*, Quart. Journ. Med. **19**, 273, 1926. — 13) *Iversen und Nakazawa*, Diese Zeitschr. 1927. — 14) *Zsigmondy und Bachmann*, Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **103**, 1918. — 15) *Lindhard*, C. r. Travaux Lab. Carlsberg **14**, 1, 1921. — 16) *Verney*, Journ. of Physiol. **61**, 319, 1926. — 17) *Ellinger und Heymann*, Schmiedebergs Arch. **90**, 336, 1921.

Zur Energetik der Aussalzung.

Von
E. A. Hafner.

(Aus der physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel.)

(Eingegangen am 4. Juli 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Inhalt.	Seite
I. Einleitung	259
II. Die Ammonsulfataussalzung von Phenol und deren Beeinflussung durch Nichtelektrolyte	261
III. Über die Elektrolytkonzentration bei der Aussalzung der Eiweißkörper	264
IV. Zur Theorie der Aussalzung.	268
V. Literatur	269

I.

Das Aussalzen ist schon mannigfach Gegenstand verschiedenster Untersuchungen gewesen.

Die ersten Versuche gehen wohl bis in die fünfziger Jahre des vorigen Jahrhunderts zurück. Aber erst durch die Arbeiten von *Franz Hofmeister* (1) (2) (3) und seinen Schülern: Zur Lehre von der Wirkung der Salze aus den Jahren 1888 und folgenden, wurden rationelle und systematische Gedanken in das bis dahin mehr empirisch und zufällig bearbeitete Gebiet getragen.

Während *O. Nasse* (4) auf spezifische Beziehungen des Salzes zu den ausgefällten Substanzen hinwies, gelang es *Franz Hofmeister*, zu zeigen, daß die aussalzende Kraft einer Salzlösung, die Gefrierpunkts- und Dampfdruckerniedrigung, die Diffusionsgeschwindigkeit, die innere Reibung, die plasmolytische Wirksamkeit und die Dissoziation offenbar ursächlich zusammenhängen, und zwar in dem Sinne, daß alle diese Erscheinungen auf eine einzige Eigenschaft, auf das Wasseranziehungsvermögen der Salze zurückgeführt werden konnten.

Quantitative Versuche zur Aussalzung wurden dann besonders von *K. Spiro* (5) (6) ausgeführt und das Aussalzen zuerst als Löslichkeitsbeeinflussung vom Standpunkt des Verteilungssatzes und der *Gibbs*schen Phasenregel aufgefaßt. Die Löslichkeitstheorie des Aussalzens von *K. Spiro*

hat dann in der Folge eine exakte thermodynamische Ausgestaltung durch *Nernst* (7), *Griesbach* (8), *Schilow* (9) und andere erhalten und dadurch ihre Leistungsfähigkeit zur Beschreibung der quantitativen Verhältnisse erneut bewiesen.

Weiter zurück reichen Versuche von *Panum*, *Kühne*, *Alex. Schmidt*, *Hoppe-Seyler* und *Weyl*, die verschiedene Aussalzbarekeit der Eiweißkörper zu ihrer Trennung und Charakterisierung zu verwenden. Durch die Arbeiten von *O. Hammarsten*, *G. Kauder*, *Pinkus*, *K. Spiro* und *Porges* (10) wurde die Aussalzung als quantitative Methode in das analytische Laboratorium des Biochemikers eingeführt und gehört seither zu den meistgebrauchten Verfahren, die uns die Bestimmung und nähere Charakterisierung der Eiweißkörper ermöglichen.

Durch die Einführung der Aktivität in die physikalische Chemie der Lösungen als thermodynamische Funktion durch *Gilbert Newton Lewis* (15) ist auch unsere Auffassung von der Aussalzung erweitert und vertieft worden. Besonders durch *Brönsted* (11) in seinen schönen Studien über Löslichkeit, durch *Bjerrum* (12), *Harkins* (13), *Debye* (14) und seine Schule ist die Lehre von der Ionenaktivität weiter ausgearbeitet worden.

Die Energetik der Aussalzung befindet sich heute noch in ihren ersten Anfängen. Die aussalzenden Systeme erfahren hierbei Energieänderungen der verschiedensten Art und Größe; verschiedene Energiegefälle greifen ineinander, so daß es heute noch nicht gelingt, diesen komplexen Vorgang vollständig und so umfassend analytisch darzustellen, derart, daß auch die vielen Ausnahmen, die auf diesem Gebiet beinahe die Regel sind, sich ohne weitere Hilfhypothesen in die Theorie einordnen ließen. Bei der Aussalzung verändert sich nicht nur die Größe, sondern auch die qualitativ-konstitutive Beschaffenheit der Grenzflächen, die Änderung der Grenzflächenenergien ist also doppelter Art: sowohl Grenzflächenkapazität wie Grenzflächenintensität nehmen ab. Ein Teil dieser Energie erscheint in Form der Aussalzungswärme, die, soweit wir bis jetzt sehen, meist positiv ist. Aber die Aussalzungswärme ist nicht nur der Ausdruck der Abnahme der Grenzflächenenergie, sondern auch die Quellungswärme des ausgesalzenen Stoffes, die Adsorptions- und Hydratationswärme der ausgesalzten Ionen sind integrierende Bestandteile der als Ganzes gemessenen Aussalzungswärme. Auch die elektrische Aussalzungsarbeit läßt sich bis heute nur qualitativ überschauen. Die freie Energie der Ionen in diesen hochkonzentrierten Lösungen, meist handelt es sich um Ganz- oder Halbsättigung, ist bis heute noch nicht bekannt, so daß auch diese Seite der Aussalzung nur einer vorläufigen Behandlung zugänglich ist. Messungen an solchen konzentrierten Lösungen liegen nur vereinzelt und unvollständig vor, so daß nicht einmal etwas Sicheres über die Größenordnung der Aussalzungsarbeit der Ionen ausgesagt werden könnte.

Mindestens so komplex ist auch die Kinetik der Aussalzung. In den nicht sichtbaren, höchstens ultravisiblen Stadien der Aussalzung

findet eine Ordnung, Dehydratation, Translationsbewegung und Aggregation der Teilchen statt. Dieser Vorgang braucht oft deutlich Zeit.

Schon *Lewith* (1) ist es aufgefallen, daß oft erst geraume Zeit nach dem Salzzusatz die Trübungen erscheinen. Mit der Aggregation der Teilchen beginnt sogleich die Wirkung der Schwerkraft augenfälliger zu werden, und die Sedimentation setzt ein. Schon *Bodländer* (16) hat hierbei merkwürdige und interessante Beobachtungen gemacht: Milchwasser und Traubenzucker labilisieren, Rohrzucker dagegen stabilisiert Kaolinsuspensionen. Auch *Quincke* (17) bemerkt, daß für die Stabilität der Suspensionen nicht nur die Elektrolyte, sondern auch die Nichtelektrolyte von Einfluß sind. *Freundlich* und *Rona* (18) fanden, daß die Koagulation von $\text{Fe}(\text{OH})_3$ durch Thymol, Campher, Aceton, Urethan begünstigt wird. *P. Rona* und *György* (19) fanden weiter, daß Kaolinsuspensionen durch Nichtelektrolyte zum Teil stabilisiert, zum Teil sensibilisiert werden. *L. von Kürthy* (20) hat am Modell Phenol-Wasser darauf hingewiesen, daß die dielektrischen Verhältnisse bei der Aussalzung eine gewichtige Rolle spielen; sie sind nicht nur ausschlaggebend für die Polarisierbarkeit der auszusalzenden Stoffe, sondern sie spielen auch eine Rolle für die Häufungsgeschwindigkeit der Teilchen. *O. Arnd* (21) konnte bei der Aussalzung der Serumeiweißkörper ferner zeigen, daß durch Coffein, Äthylalkohol, Aceton, Cholesterin und Lecithin infolge von Komplexbildung der Dipolcharakter der Eiweißkörper verändert wird, ihre elektrische Polarisierbarkeit sinkt und die Aussalzbarkeit abnimmt. Umgekehrt scheint Formaldehyd den Dipolcharakter der Eiweißstoffe zu vermehren. Die vorliegende Untersuchung¹ stellt eine Fortsetzung der Arbeiten von *L. v. Kürthy* und von *O. Arnd* dar und bringt einen geringen Beitrag zur Kenntnis der Aussalzung.

II.

In dem Folgenden wurde zunächst die Veränderung der Polarisierbarkeit durch zugesetzte Nichtelektrolyte untersucht. Hierfür schien das System Phenol-Wasser besonders geeignet. Als Maß diente die Aussalzbarkeit des Phenols durch Ammonsulfat. Wir verzichten hier auf eine ausführliche Wiedergabe der Protokolle und geben die mehr als 60 Versuche umfassenden Reihen in Tabelle I wieder. Hierbei sind die Konzentrationen stets auf das konstant gehaltene Gesamtvolumen bezogen. + bedeutet Aussalzung, — bedeutet keine Aussalzung. Das Resultat wurde stets 10 Minuten nach Mischung der Lösungen abgelesen. Gearbeitet wurde bei Zimmertemperatur.

Aus Tabelle I geht hervor, daß Glykokoll, Harnstoff und Aceton eine Zunahme der Aussalzbarkeit des Phenols bewirken. Dies dürfte um so mehr von Interesse sein, als schon *K. Spiro* (22) zeigen konnte, daß Harnstoff den Hitze-Gerinnungspunkt des Serums erhöht, daß aber Glykokoll und Harnstoff, wie wir neuerdings beobachteten, die Aussalzbarkeit der Serumeiweißkörper vermehren. Glycerin und

¹ Die vorliegenden Versuche habe ich im Dezember 1924 in der physiologisch-chemischen Anstalt Basel ausgeführt.

Tabelle I.

Aussalzbarkeit einer 4,3%igen Phenollösung bei Zimmertemperatur durch Ammonsulfat.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	11,15 ‰	8,6 ‰	6,5 ‰	5,35 ‰	4,30 ‰	2,10 ‰
Ohne Zusatz	+++	+++	++	±	—	—
4,6 % Glykokoll	+++	+++	++	+	+	—
0,2 % Aceton	+++	+++	++	++	+	—
6 % Harnstoff	+++	+++	+++	++	+	+
18,4 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	+++	++	++	—	—	—
17,1 % Glycerin	+	—	—	—	—	—
6 % Traubenzucker	+++	+++	++	++	—	—
12 % Rohrzucker	+++	+++	++	+	—	—

Alkohol vermindern die Aussalzbarkeit des Phenols. Glycerin scheint nach unseren Erfahrungen auch die Aussalzung der Eiweißkörper zu hemmen. Glucose und Rohrzucker scheinen die Aussalzbarkeit nur wenig zu beeinflussen, immerhin zeigt sich eine geringe Tendenz zur Zunahme der Aussalzbarkeit.

Die Abnahme bzw. Zunahme der Aussalzbarkeit durch Zusatz von Nichtelektrolyten kann 1. darauf beruhen, daß infolge der dielektrischen Veränderung des Milieus die relative Polarisierbarkeit des auszusalzenden Stoffes verändert wird, oder 2., wie schon O. Arnd (20) für die Eiweißkörper gezeigt hat, der Dipolcharakter des auszusalzenden Stoffes infolge Komplexbildung verändert wird, und schließlich 3., worauf Hofmeister hingewiesen hat, daß durch den Nichtelektrolytzusatz die Hydratation vermehrt oder vermindert wird. Auch hier vermochte die optische Untersuchung, wie schon mehrfach (20) (21), Aufschluß über die Komplexbildung zu geben. Die Tabelle II enthält den Brechungsanteil von 5,4 % Phenol in verschiedenen Medien, die spezifische Refraktion des Phenols (= Brechungsanteil von 1 g. % Phenol) und die Differenz bezogen auf Wasser als Normalzustand.

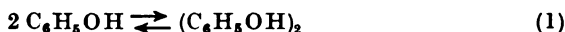
Tabelle II.

Beeinflussung des Brechungsanteils einer 5,4%igen Phenollösung durch verschiedene Zusätze.

	Gesamt n . 10 ⁻⁵	Spez. Refraktion n . 10 ⁻⁵	Differenz n . 10 ⁻⁵
In H_2O	1141	212	0
23 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	1135	210	— 2
10,7 % Glycerin	1163	215	+ 3
7,5 % Harnstoff	1082	200	— 12
6 % Glykokoll	1154	214	+ 2
15 % Rohrzucker	1182	219	+ 7
7,5 % Traubenzucker	1159	214	+ 2
0,25 % Aceton	1159	215	+ 2

Der Fehler der refraktometrischen Bestimmung beträgt etwa $\pm 2,6 \cdot 10^{-5}$, für die spezifische Refraktion etwa $\pm 0,5 \cdot 10^{-5}$. Nun ist bekanntlich der Brechungsexponent direkt proportional der Zahl der Moleküle (20). Kolumne 2 in der Tabelle II illustriert deutlich, daß Harnstoff die Zahl der Phenolmoleküle vermindert: Harnstoff wirkt polymerisierend. Umgekehrt wird die Zahl der Phenolmoleküle durch Rohrzucker und Glycerin vermehrt; Rohrzucker und Glycerin bewirken eine Depolymerisation.

K. Glenz (23) hat aus dem Verhalten der Refraktion von Phenollösungen bei Salzzusatz auf verschiedene Modifikationen des Phenols in konzentrierten Lösungen geschlossen [vgl. hierzu auch K. Spiro (32)]. J. Livingston, R. Morgan und G. Egloff (24) leiteten schon einige Jahre vorher aus ihren Messungen der Oberflächenspannung, der spezifischen Kohäsion, der Dichte und der Viskosität der Phenollösungen ab, daß verschiedene Hydratformen des Phenols miteinander im Gleichgewicht stehen, und zwar gelangten die Autoren zu folgenden Hydratstufen: $C_6H_5OH \cdot 3H_2O$, $C_6H_5OH \cdot 9H_2O$ und $C_6H_5OH \cdot 55H_2O$. A. Grollmann und J. C. W. Frazer (25) zeigten an Hand ihrer Messungen des osmotischen Druckes, daß in wässrigen Phenollösungen außerdem folgendes Gleichgewicht besteht:



und daß schon von 0,5% Phenol an das Gleichgewicht nach rechts verschoben ist, so daß bei 0,94% bereits 86% in Form des polymeren $(C_6H_5OH)_2$ vorhanden sind und in 8,5%igen Lösungen bei 30°, also an der Grenze der Löslichkeit, bereits 99% in polymerer Form vorhanden sind.

Harnstoff verschiebt also das Gleichgewicht (1) nach rechts, die Löslichkeit nimmt ab und die Aussalzbarekeit steigt; umgekehrt verschiebt Glycerin das Gleichgewicht nach links und wirkt so löslichkeitssteigernd und stabilisierend. Eigentümlich ist das Verhalten der Zucker: Rohrzucker verschiebt das Gleichgewicht stark nach links, Rohrzucker müßte also stabilisierend wirken, auch nach seinem dielektrischen Verhalten wäre dies zu erwarten, Rohrzucker und Traubenzucker vermehren aber, wenn auch nur gering, die Aussalzbarekeit des Phenols. Offenbar überwiegt hier die Hydratation der Rohrzuckermoleküle [R. Fricke (26)] die übrigen Wirkungen, so daß sich in erster Linie die Entziehung des Lösungsmittels geltend macht.

Außerdem haben die zugefügten Nichtelektrolyte noch eine dielektrische Wirkung: Harnstoff und Glykokoll erhöhen die Dielektrizitätskonstante des Milieus [Literatur bei (27)], die relative Polarisierbarkeit des Phenols nimmt infolgedessen zu, schon bei geringer Feldstärke, bei kleinerer Ionenkonzentration erreicht die Polarisation jenen Wert, der zur Translation und zur Aggregation der Teilchen an Punkten geringster Feldstärke genügt; mit anderen Worten die Aussalzbarekeit des Phenols nimmt zu; genau dielektrisch im entgegengesetzten Sinne, wirken Glycerin und Alkohol. Abweichend verhält sich nur Aceton. Hier handelt es sich offenbar um kompliziertere Ver-

hältnisse. Einmal beobachtet man bei Zusatz eines Kubikzentimeters einer 10%igen Acetonlösung zu 3 ccm einer gesättigten Phenollösung das Ausfallen weißer Massen, und andererseits ist seit *Link* und *Bargellini* (43) bekannt, daß Phenol mit Aceton α -Phenoxyisobuttersäure unter Abnahme der Löslichkeit bilden kann. Das abweichende Verhalten des Acetons findet deshalb möglicherweise durch seine chemischen Beziehungen zum Phenol teilweise Erklärung.

III.

Das Aussalzen geschieht durch hochkonzentrierte Salzlösungen, mit anderen Worten in die Lösung des Nichtelektrolyten wird stets eine große Elektrizitätsmenge gebracht. Wir beschränken uns in dem Folgenden auf die Salze MgSO_4 , Na_2SO_4 und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, als die für die Aussalzung der Eiweißkörper wichtigsten Salze. Es ist hierbei seit altersher üblich, als Maß für die Salzkonzentration den Grad der Sättigung in Prozenten anzugeben. So wird z. B. Euglobulin durch Halbsättigung mit MgSO_4 oder durch ein Drittel Sättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgesalzen; Gesamtglobulin wird durch Halbsättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, durch Ganzsättigung mit MgSO_4 oder durch Halbsättigung mit Na_2SO_4 bei 37° ausgesalzen, usw. Bedenkt man, wie schwankend die Angaben über die Löslichkeit der Salze sind und wie außerordentlich abhängig ferner die Sättigungskonzentrationen von Temperatur und kleinsten Verunreinigungen sind, so kann es nicht wundernehmen, daß die verschiedenen Autoren mit ganz verschieden konzentrierten Lösungen gearbeitet haben. Für das Aussalzen der Globuline mit Na_2SO_4 bei über 33° sind z. B. notwendig nach:

<i>Hofmeister</i> (28)	21,3 bis 24,0 %
<i>Pinkus</i> (29)	18,8 „ 20,0 %
<i>Spiro</i> und <i>Porges</i> (30)	22,9 %
<i>P. E. Howe</i> (31)	21,5 %

Die Verfeinerung der Methodik, besonders die Verwendung der Refraktometrie, Interferometrie und Präzisionspolarimetrie bei der Untersuchung, Charakterisierung und Isolierung der Eiweißkörper, verlangt auch eine bedeutende Präzisierung der aussalzenden Konzentrationen. Es sind viele Unstimmigkeiten, nicht zuletzt auch die verschiedenen Angaben in neuerer Zeit über den spezifischen Brechungszuwachs der Eiweißkörper (21), auf die Verwendung der „ $\frac{1}{2}$ “- und „ $\frac{1}{3}$ “-gesättigten Lösungen zurückzuführen. *P. E. Howe* (33), (31), (34), (35) hat deshalb schon vor 6 Jahren die Mol-Volumen-Konzentration, d. h. die Anzahl Gramm-Mol in einem Liter Lösung, eingeführt, so daß auch seine konzentrierten Salzlösungen nun immer dieselbe, exakt eingestellte Konzentration haben. Die fällenden Konzentrationen an anhydrischem Salz sind nach *Howe*:

	MgSO ₄	Na ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄
Euglobulin . . .	19,5% = 1,62 m.	14,2% = 1,00 m.	19,8% = 1,50 m.
Gesamtglobulin .	28,6% = 2,37 m.	26,4% = 1,50 m.	26,4% = 2,00 m.
Gesamteiweiß . .		2,75 m.	3,25 m.

Noch vorteilhafter dürfte möglicherweise die Molkonzentration sein, d. h. die Anzahl Gramm-Mol der gelösten Substanz in 55,51 Mol. Wasser. Wie *Lewis* hervorhebt, hat die Molkonzentration den Vorteil, daß sie unabhängig ist von der Temperatur, während dies bei der gewöhnlichen Mol-Volumenkonzentration bekanntlich nicht der Fall ist. Wir werden im folgenden von der Molkonzentration Gebrauch machen und bezeichnen sie mit $\bar{m}$., während sich m . auf die Anzahl Mol in einem Liter Lösung beziehen soll.

Nach *Howe* berechnet sich die notwendige Salzkonzentration ausgedrückt in $\bar{m}$. für

	MgSO ₄	Na ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄
Euglobulin	2,01 $\bar{m}$.	1,17 $\bar{m}$.	1,87 $\bar{m}$.
Gesamtglobulin	3,33 $\bar{m}$.	1,93 $\bar{m}$.	2,71 $\bar{m}$.

Es ist nun auffallend, daß zur Abscheidung ein und desselben Kolloides, z. B. des Euglobulins, je nach dem Salz ganz verschiedene Konzentrationen notwendig sind, auch bei gleichem Anion. *O. Nasse* (4) hat deshalb auch die Vermutung ausgesprochen, daß es sich hierbei um spezifische Beziehungen zwischen dem aussalzenden und dem ausgesalzenen Stoff handeln könnte. Der experimentelle Nachweis dieser Annahme konnte aber bis heute nie einwandfrei geleistet werden.

Nun liegen aber für die Konzentrationen der Sulfate, wie sie zur Aussalzung der Euglobuline verwendet werden, Gefrierpunktsbestimmungen vor, die es uns ermöglichen, einige Aussagen über die aussalzende Wirkung dieser Lösungen zu machen. *Van 't Hoff* hat bekanntlich zur Darstellung des osmotischen Druckes von Elektrolytlösungen in die Gasgleichung den Faktor i eingeführt, d. h. den Quotienten aus der gemessenen Gefrierpunktserniedrigung dividiert in die gedachte Gefrierpunktserniedrigung, die vorhanden wäre, wenn jede Dissoziation fehlen würde. Nachdem nun aber erst kürzlich durch *M. Randall* und *G. N. Scott* (36) nachgewiesen wurde, daß auch die Sulfate, entgegen der allgemein verbreiteten Ansicht, zu den typisch starken, total dissoziierenden Elektrolyten zu zählen sind, scheint es uns zweckmäßig, folgende Größe, die wir mit h bezeichnen wollen, einzuführen: Es sei Δ^0 die gemessene Gefrierpunktserniedrigung und Δ^∞ sei die gedachte Gefrierpunktserniedrigung, die vorhanden wäre, wenn es sich um eine ideelle, total dissoziierte Lösung handeln würde, wobei

sich die geladenen Teilchen gegenseitig weder elektrisch noch mechanisch beeinflussen sollen, dann sei

$$h = \frac{\Delta^0}{\Delta_\infty^0}. \quad (2)$$

Aus (2) geht hervor, daß somit $1 - h$ ein Ausdruck der interionischen Kräfte, der Assoziation, der Dissoziation, des Dielektrikums usw., darstellt. Wir haben nun in Tabelle III aus den Gefrierpunktsbestimmungen von *Bedford* (37), *Raoult* (38), *Harkins* (39), *S. H. Rodebush* (40) und *W. Kistiakowsky* (41) h berechnet; Δ^0 ist die gemessene molare Gefrierpunktserniedrigung, $\bar{m}$ ist die Molkonzentration.

Tabelle III.

MgSO ₄			Na ₂ SO ₄			(NH ₄) ₂ SO ₄		
$\sqrt[3]{\bar{m}}$	Δ^0	h	$\sqrt[3]{\bar{m}}$	Δ^0	h	$\sqrt[3]{\bar{m}}$	Δ^0	h
0,01	3,70	0,99	0,07	5,09	0,91	0,17	4,90	0,88
0,02	3,64	0,98	0,10	4,95	0,89	0,27	4,50	0,80
0,05	3,10	0,83	0,15	4,81	0,86	0,45	4,09	0,73
0,07	2,98	0,80	0,22	4,59	0,82	0,73	3,87	0,69
0,11	2,76	0,74	0,32	4,35	0,78	0,79	3,60	0,64
0,22	2,42	0,65	0,45	4,06	0,73	0,95	3,70	0,66
0,47	2,06	0,55	0,73	3,68	0,66	1,07	3,60	0,66
0,70	2,02	0,54				1,23	3,59	0,64
1,23	2,08	0,56				1,76	3,35	0,60
1,32	2,24	0,60						
1,64	2,62	0,70						

Die aussalzenden Konzentrationen für Euglobulin sind für MgSO₄ 1,42 $\bar{m}^{1/2}$, für Na₂SO₄ 1,08 $\bar{m}^{1/2}$, für (NH₄)₂SO₄ 1,37 $\bar{m}^{1/2}$. Sucht man nun in Abb. I die zugehörigen Ordinaten, so bemerkt man, daß für

$$\begin{aligned} 1,42 \bar{m}^{1/2} \text{ MgSO}_4 & \dots \dots \dots h = 0,64 \\ 1,37 \bar{m}^{1/2} \text{ (NH}_4)_2\text{SO}_4 & \dots \dots \dots h = 0,64 \\ 1,08 \bar{m}^{1/2} \text{ Na}_2\text{SO}_4 & \dots \dots \dots h = 0,64^1 \end{aligned}$$

Die Euglobuline fallen dann also aus, wenn $h = 0,64$ ist, gleichgültig ob es sich um Na₂SO₄, MgSO₄ oder (NH₄)₂SO₄ handelt. Wir haben oben bei der Definition von h gezeigt, daß $1 - h$ ein Maß für die Gesamtheit aller interionischen Kräfte darstellt. Je kleiner $1 - h$, desto größer die Wirkung bzw. die Zahl der freien Ionen. Man könnte nun nach den oben mitgeteilten Zahlen versucht sein, anzunehmen, ganz analog den Überlegungen der Dissoziationstheorie, daß der Ausdruck $h/1 - h = \Delta^0/\Delta_\infty^0 - \Delta^0$ für die aussalzende Eigenschaft der Salze charakteristisch wäre. Dies ist aber nicht der Fall. Geht man in der MgSO₄-Kurve nach geringeren Konzentrationen, so bemerkt man,

¹ Extrapoliert.

daß die Kurve bei $\sqrt[3]{m} = 0,21$ wieder die Ordinate 0,64 hat. Bei einer $MgSO_4$ -Konzentration von $0,21 \sqrt[3]{m}$ (= etwa $\frac{1}{2}\%$) fällt aber überhaupt noch kein Eiweiß aus. Damit ist gezeigt, daß die Größe h zur Charakterisierung der aussalzenden Kräfte noch nicht genügt, sondern hier spielt offenbar *noch eine extensive Größe, die absolute Zahl der nicht-freien Ionen eine ebenso bedeutende Rolle.*

Unter den „nichtfreien Ionen“ versteht man solche Ionen, die entweder infolge gegenseitiger Beeinflussung oder infolge starker Hydratation nach „außen“ keine ionalen Wirkungen entfalten. Ist also neben h auch die absolute Zahl der nichtfreien Ionen für die Aus-

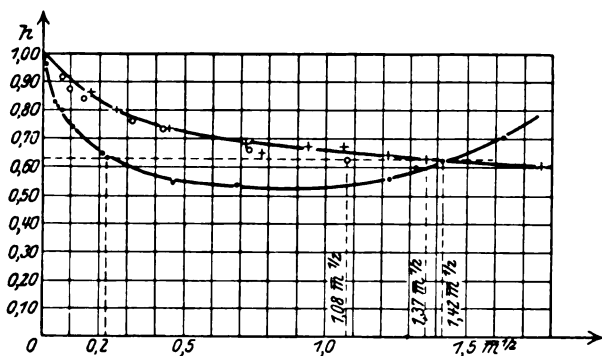


Abb. 1.

salzung maßgebend, so heißt dies in anderen Worten nichts anderes, als daß, da jedem Ion bei einer bestimmten Konzentration eine bestimmte Hydratationszahl zukommt, eine gewisse Menge Lösungsmittel in Form des Hydratationswassers erst verschwinden muß, bevor die Wirkung der polarisierenden, freien Ionen zur Auswirkung kommen kann. Damit gelangen wir, wenn auch auf anderem Wege und vor allem durch quantitative Überlegungen zu verwandten Anschauungen, wie sie *F. Hofmeister* (2) vor 40 Jahren zum Teil bereits entwickelt hatte. *Hofmeister* hatte damals auf Beziehungen des osmotischen Druckes der Elektrolytlösungen zu ihrem Aussalzungsvermögen hingewiesen und das wechselnde Wasseranziehungsvermögen der Salze als gemeinsame Ursache des verschiedenen Verhaltens der Elektrolyte zur Erklärung der Erscheinungen herangezogen. Seiner Hydratationstheorie der Aussalzung erwuchsen dadurch Schwierigkeiten, daß z. B. stark hydratisierte Elektrolyte wie Li_2SO_4 weniger aussalzend wirken, als z. B. Na_2SO_4 mit geringerer Hydratation. Wir haben nun oben gezeigt, daß für den Aussalzungseffekt notwendig ist 1. nicht nur eine gewisse Verminderung an freiem Lösungsmittel infolge der Hydratation, sondern auch 2. eine gewisse Polarisation des Eiweißes durch die freien Ionen.

Damit dürften die Schwierigkeiten der Hydratationstheorie zum größten Teil überwunden sein.

Wir haben bis jetzt nur von der Größe h gesprochen und es bis jetzt sorgfältig vermieden, von der Aktivität der Salzlösungen zu reden. Dies geschah deshalb, weil für die hochkonzentrierten Elektrolytlösungen ($\frac{1}{2}$ - und $\frac{1}{1}$ -Sättigung) die Berechnung der Aktivität, d. h. der freien Energie der Ionen, noch nicht möglich ist, da wir über die Verdünnungswärme und über die Temperaturkoeffizienten der konzentrierten Lösungen ungenügend unterrichtet sind; außerdem spielt in den konzentrierten Lösungen die Größe der Ionen im Verhältnis zum Lösungsraum eine nicht mehr zu vernachlässigende Rolle. Infolgedessen gilt das *Gay-Lussac*, *Boyle-Mariottesche* Gesetz in seiner einfachen Form nicht mehr; die höheren Potenzen der Konzentrationen dürfen nicht mehr vernachlässigt werden. Die Größe h ist also größer als der Aktivitätskoeffizient, doch dürfte die Änderung von h mit der Konzentration auch der Änderung des Aktivitätskoeffizienten ziemlich parallel gehen. Je verdünnter natürlich die Lösungen sind, desto mehr nähern sie sich dem Idealfall, desto näher rückt h an 1 und desto mehr fallen osmotischer Koeffizient und h zusammen.

IV.

In dem Folgenden geben wir eine kurze Zusammenfassung unserer Anschauung von der Aussalzung, die wir auf Grund dieser und früherer Arbeiten gewonnen haben (20), (21), (27), (42).

Für die Aussalzung ist wesentlich, daß eine große Menge Ionen, mit anderen Worten eine große Elektrizitätsmenge, in die wässrige Lösung des Nichtelektrolyten eingetragen wird. Ein Teil dieser Ionen besteht aus freien Ionen, ihre Konzentration bezeichnet man als aktive Masse. In der Umgebung dieser freien Ionen bestehen starke elektrische Felder, wodurch die Umgebung, Lösungsmittel und gelöster Stoff, polarisiert werden. Hierfür gilt bekanntlich, wie früher dargelegt wurde (27),

$$P = E \cdot \frac{D - 1}{4\pi}, \quad (3)$$

wobei

$$\begin{aligned} P &= \text{Polarisation,} \\ D &= \text{Dielektrizitätskonstante,} \\ E &= \text{Elektrische Feldstärke,} \\ \pi &= 3,14 \dots \end{aligned}$$

Die relative Polarisierbarkeit des gelösten Stoffes, d. h. dessen Polarisierbarkeit im Verhältnis zur Polarisierbarkeit des Lösungsmittels hängt ab:

1. vom Dipolcharakter des gelösten Stoffes und
2. von den dielektrischen Eigenschaften des Lösungsmittels.

Wir haben in der vorliegenden Untersuchung und in früheren Arbeiten für beide Abhängigkeiten Beispiele beigebracht. Meist liegen die Verhältnisse so, daß der auszusalzende Stoff die geringere Dielektrizitätskonstante hat als das Lösungsmittel. Infolge der Polarisierung der Teilchen des auszusalzenden Stoffes bewegen sich diese im elektrischen Felde der freien Ionen nach Orten geringster Feldstärken. Es hängt nun lediglich von der absoluten Zahl der nichtfreien Ionen ab, bzw. von der Größe des Entzuges freien Lösungsmittels infolge der Hydratation, ob die Anhäufung der Teilchen des auszusalzenden Stoffes an Orten geringster Feldstärke bis zur sichtbaren Zweiphasenbildung, also zur Aussalzung führt, oder ob lediglich eine andere Verteilung mit eventueller Polymerisation ohne sichtbare Zustandsänderung statthat.

Literatur.

- 1) *S. Lewith*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **24**, 1, 1888. — 2) *F. Hofmeister*, ebendaselbst **24**, 247, 1888. — 3) *Derselbe*, ebendaselbst **25**, 1, 1889. — 4) *O. Nasse*, Pflügers Arch. **41**, 504, 1887. — 5) *K. Spiro*, Habilitationsschrift Straßburg 1897. — 6) *Derselbe*, Hofmeisters Beitr. **4**, 300, 1903. — 7) *W. Nernst*, Zeitschr. f. physik. Chem. **38**, 487, 1901. — 8) *Griesbach*, ebendaselbst **97**, 22, 1921. — 9) *N. Schilow*, ebendaselbst **101**, 353, 1922. — 10) Literatur bei Nr. 21. — 11) *Brönsted*, Journ. Amer. Chem. Soc. **42**, 76, 1920; **42**, 1448, 1921; **43**, 2266, 1921; **44**, 877, 1922. — 12) *N. Bjerrum*, Ergebn. d. exakt. Naturw. **5**, 125, 1926. — 13) *Harkens*, Journ. Amer. Chem. Soc. **33**, 1807, 1911 und folg. — 14) *Hückel*, Ergebn. d. exakt. Naturw. **3**, 199, 1924 (Literatur). — 15) *G. N. Lewis*, Thermodynamics 1923 (Literatur). — 16) *Bodländer*, N. Jahrb. f. Min. **2**, 147, 1893. — 17) *Quincke*, Anal. d. Phys. **312**, 57, 1902. — 18) *H. Freundlich* und *Rona*, diese Zeitschr. **81**, 87, 1917. — 19) *Rona* und *György*, ebendaselbst **105**, 133, 1920. — 20) *L. v. Kürthy*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **104**, 148, 1924. — 21) *O. Arnd*, diese Zeitschr. **167**, 440, 1926. — 22) *K. Spiro*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**, 182, 1900. — 23) *K. Glenz*, Helvetica **6**, 826, 1923. — 24) *I. Livingstone*, *R. Morgan*, *O. Egloff*, Journ. Amer. Chem. Soc. **83**, 844, 1916. — 25) *A. Grolman* und *J. C. W. Frazer*, ebendaselbst **45**, 1705, 1923. — 26) *R. Fricke*, Kolloid.-Zeitschr. **85**, 264, 1924. — 27) *E. A. Hafner*, Ergebn. d. Physiol. **24**, 566, 1925. — 28) *F. Hofmeister*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **24**, 257, 1888. — 29) *Pinkus*, Journ. Physiol. **27**, 57, 1901. — 30) *Spiro* und *Porges*, Hofmeisters Beitr. **3**, 277, 1902. — 31) *P. E. Howe*, Journ. of biol. chem. **57**, 241, 1923. — 32) *K. Spiro*, Pflügers Arch. **205**, 15, 1924. — 33) *P. E. Howe*, Journ. of biol. chem. **49**, 109, 1921. — 34) *Derselbe*, ebendaselbst **49**, 93, 1921. — 35) *Derselbe*, Physiol. Rev. **5**, 349, 1925. — 36) *M. Randall* und *G. N. Scott*, Journ. Amer. Chem. Soc. **49**, 647, 1927. — 37) *Bedford*, Proc. Roy. Soc. **83**, 459, 1910. — 38) *Raoult*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **2**, 489, 1888. — 39) *Harkins*, Journ. Amer. Chem. Soc. **88**, 2672, 1920. — 40) *W. H. Rodebush*, ebendaselbst **40**, 1209, 1918. — 41) *W. C. Kistiakowsky*, Zeitschr. f. physik. Chem. **6**, 169, 1890. — 42) *E. A. Hafner*, diese Zeitschr. **105**, 29, 1925. — 43) *Gazzetta Chimica Italia* **36**, II, 333.

Oberflächenenergie einiger physiologischer Flüssigkeiten. I.

Von

Nikolaus Wwedensky¹.

(Aus dem physiologischen Laboratorium Krupskaja-Akademie Moskau.)

(Eingegangen am 10. Juni 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die heutigen physikalischen Untersuchungen der Oberflächeneigenschaften von Lösungen bestimmen ihre mehr oder weniger große Oberflächenaktivität nach der Änderung der Oberflächenspannung mit der Konzentration des in der Lösung enthaltenen Stoffes. Bedient man sich der Gesetze der Thermodynamik, so läßt sich die gesamte Oberflächenenergie pro 1 qcm in folgender Form darstellen:

$$E = \sigma + q; \quad (1)$$

hier ist E die gesamte Oberflächenenergie der Oberflächeneinheit einer Flüssigkeit, σ die Oberflächenspannung, welche die zur Bildung der Oberflächeneinheit erforderliche Arbeit ausdrückt, q die Bildungswärme der Oberflächeneinheit.

Thermodynamisch erhält man für q : $T \frac{\partial \sigma}{\partial T}$ *; setzen wir diesen Ausdruck in die Gleichung (1), so erhalten wir (*W. Thomson-Kelvin*):

$$E = \sigma - T \frac{\partial \sigma}{\partial T}. \quad (2)$$

Für reine Flüssigkeit ist festgestellt, daß ihre Oberflächenspannung (σ) linear mit der Temperatur abnimmt (d. h. $\frac{\partial \sigma}{\partial T} = \text{const} = \alpha$); in diesem Falle kann man nachweisen, daß wir bei Differenzierung der Gleichung (2) als Endresultat erhalten:

$$\frac{\partial E}{\partial T} = 0, \quad (3)$$

¹ Mitgeteilt am 10. November 1926 in der Moskauer Abteilung der Russischen Pathologischen Gesellschaft und am 27. November 1926 auf einem Kollegium im Moskauer Institut für Physik und Biophysik.

* *Freundlich*, Kapillarchemie 1922.

d. h. daß sich die gesamte Oberflächenenergie reiner Flüssigkeiten mit der Temperatur nicht ändert (*Einstein*¹, *Harkins*²). *P. Reh binder*³ hat nachgewiesen, daß wir genau dasselbe auch bei Lösungen inaktiver Stoffe antreffen, welche die Größe der Oberflächenspannung des Wassers wenig verändern und daß ihr Temperaturkoeffizient $\left(-\frac{\partial \sigma}{\partial T}\right)$ bei Temperaturänderung der Lösung praktisch konstant bleibt. Dagegen ergeben Lösungen solcher Stoffe, wie z. B. von Fettsäuren, die eine starke Abnahme der Oberflächenspannung des Wassers hervorrufen (im untersuchten Temperaturintervall von 0 bis 100° C), in Abhängigkeit von der Temperaturänderung eine charakteristisch gekrümmte Kurve der Veränderung ihrer Oberflächenspannung.

Es ist klar, daß die gesamte Oberflächenenergie bei solchen Lösungen keine konstante sein kann, wie z. B. bei reinem Wasser und anderen reinen Flüssigkeiten⁴.

Die Abnahme der Oberflächenspannungen von Lösungen hängt von der Adsorption des gelösten Stoffes durch die Oberflächenschicht der Lösung ab. Die Abhängigkeit der Adsorption des Stoffes von seiner Konzentration folgt der bekannten *Gibbs*schen Gleichung:

$$\Gamma = -\frac{\partial \sigma}{\partial c} \cdot \frac{c}{RT}, \quad (4)$$

hier ist Γ die Adsorption des Stoffes in Grammolekülen, σ die Oberflächenspannung, c die Konzentration in Grammolekül-Liter, R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur.

P. Reh binder hat für die quantitative Charakteristik oberflächenaktiver Stoffe die von ihm Oberflächenaktivität genannte Größe $-\frac{\partial \sigma}{\partial c} = G$ vorgeschlagen. Diese Größe G steht nach der *Gibbs*schen Gleichung mit der Adsorption in Zusammenhang:

$$G = RT \frac{\Gamma}{c}.$$

Die physiologischen Flüssigkeiten stellen meist Lösungen von sehr komplizierter Zusammensetzung und unbestimmter Konzentration dar. Daher ist es unmöglich, auf Grund von Untersuchungen der Oberflächenspannung, als Funktion der Konzentration $\sigma = f(c)$, ihre Oberflächeneigenschaften zu charakterisieren. Untersuchen wir jedoch die Oberflächenspannung physiologischer Flüssigkeiten mit Temperaturveränderung, so erhalten wir die Möglichkeit, ihre Oberflächenaktivität zu charakterisieren, d. h. ihre gesamte Oberflächenenergie muß, wie das aus Gleichung (2) ersichtlich ist, von der Temperatur abhängen.

¹ *Einstein*, Ann. d. Phys. 4, 513, 1901.

² *Harkins*, Journ. Amer. Chem. Soc. 42, 1920.

³ *P. Reh binder*, Zeitschr. f. phys. Chem. 111, 447, 1924.

⁴ *Derselbe*, Über Oberflächeneigenschaften von Lösungen, Journ. d. Russ. Phys.-Chem. Gesellsch., phys. Teil, 56, H. 5/6, 1925.

Endlich hat *P. Reh binder*¹ noch gezeigt, daß die Oberflächenaktivität

$$G = \frac{\partial \sigma}{\partial c} = A T \Gamma \quad (5)$$

bei c konstant, bei Temperaturveränderung im Intervall zwischen absoluter Null ($T = 0$) und kritischer Temperatur ($T = T_k$) ein Maximum hat, da bei $T = 0$ und $G = 0$ und bei T_k die Oberflächenspannung einer Lösung zu Null wird; folglich nähert sich bei $T = T_k$ auch die Oberflächenaktivität Null.

Wie aus dem Diagramm ersichtlich, müssen wir hierbei gegenüber dem untersuchten Temperaturintervall von 0 bis 100° C drei Möglichkeiten für die Lage des Maximums zugeben.

Das bedeutet, daß im untersuchten Intervall $G(T)$ (die Oberflächenaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur) entweder mit der Temperatur abnehmen (ihr Maximum liegt links) oder zunehmen kann (in diesem Falle wird das Maximum bei einer höheren Temperatur beobachtet), oder aber endlich zwischen 0 und 100° C ein Maximum hat. Das Vorhandensein eines Maximums der Kurve $G(T)$ (Oberflächenaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur) kann als Beweis der Oberflächenaktivität einer Lösung dienen (Adsorption eines Stoffes in der Oberflächenschicht).

Bei oberflächenaktiven Lösungen hat die Oberflächenaktivität ($\overline{G}$) in der von uns untersuchten Zone von 0 bis 100° C ein Maximum.

Da bei physiologischen Flüssigkeiten, wie bereits oben bemerkt, die Konzentration der in der Lösung enthaltenen Stoffe unbestimmt ist, so können wir unter der Annahme, daß sich ihre Konzentration mit der Temperatur nicht ändert (d. h. $c = \text{const}$), die Oberflächenaktivität (Adsorption) bei physiologischen Flüssigkeiten nach der Größe der Depression der Oberflächenspannung im Vergleich mit reinem Wasser bei verschiedenen Temperaturen ($\Delta \sigma$) messen.

Dann wird die Ordinatendifferenz der Oberflächenspannung des Wassers und der untersuchten Flüssigkeit im Diagramm (s. Abbildung) eine Größe darstellen ($\Delta \sigma_r$), durch welche die Adsorption von Stoffen, die bei verschiedenen Temperaturen in dieser Flüssigkeit gelöst sind, gemessen wird:

$$\Delta \sigma_r = f(T) \quad (6)$$

hier ist $\Delta \sigma$ die Ordinatendifferenz der Oberflächenspannung des Wassers und einer beliebigen physiologischen Flüssigkeit bei entsprechender Temperatur (T).

¹ *P. Reh binder*, Journ. d. Rus. Phys.-Chem. Gesellsch., phys. Teil, 58, H. 3, 524.

Im Falle des Vorhandenseins eines Maximums $\Delta\sigma_T = f(T)$ in den Grenzen von 0 bis 100° C muß die gegebene Flüssigkeit als oberflächenaktiv betrachtet werden.

Nach der von P. Reh binder¹ modifizierten Maximalblasendruckmethode (M. Cantor) habe ich einige physiologische Flüssigkeiten — Serum, defibriertes Blut, Galle, Milch, Speichel, Magensaft, Humor aquaeus, Cerebrospinalflüssigkeit und Harn — untersucht.

Auf Grund meiner Versuche lassen sich die erwähnten physiologischen Flüssigkeiten in drei Gruppen verteilen: 1. in inaktive Flüssigkeiten, 2. in wenig oberflächenaktive Flüssigkeiten und 3. in oberflächenaktive Flüssigkeiten.

Eine derartige Charakteristik ihrer Oberflächeneigenschaften entspringt sowohl aus der Veränderung der Oberflächenspannung als auch aus der gesamten Oberflächenenergie dieser physiologischen Flüssigkeiten mit der Temperatur, wie das aus den angeführten Tabellen und Kurven ersichtlich ist.

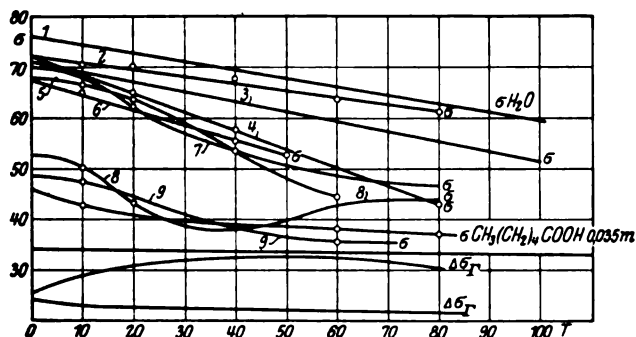


Abb. 1.

- | | |
|---|--|
| 1 σ -t Kurve des reinen Wassers. | 6 σ -t Kurve der cerebrospinalen Flüssigkeit. |
| 2 σ -t Kurve des Harns. | 7 σ -t Kurve des Speichels. |
| 3 σ -t Kurve des Magensaftes. | 8 σ -t Kurve der Milch. |
| 4 σ -t Kurve des Humor aquaeus. | 9 σ -t Kurve der Galle. |
| 5 σ -t Kurve des Serums. | |

I ($\Delta\sigma$)_T — Kurve des Speichels.II ($\Delta\sigma$)_T — Kurve des Harns.

Demnach ändert sich die gesamte Oberflächenenergie physiologischer Flüssigkeiten mit der Temperatur entweder fast gar nicht, oder aber sie zeigt bei einer gewissen Temperatur ein scharfes Ansteigen mit einem Maximum.

Im ersten Falle wird die Oberflächenspannung der Flüssigkeit mit der Temperatur linear abnehmen, während wir im zweiten Falle

¹ P. Reh binder, diese Zeitschr. 1927 (im Druck). Zeitschr. f. Exp. Biol. u. Medizin Nr. 14, 1927 (russisch).

für die Veränderung der Oberflächenspannung einer Flüssigkeit mit der Temperaturveränderung eine charakteristische Kurve erhalten (s. Kurven).

Demzufolge erhalten wir für verschiedene physiologische Flüssigkeiten eine verschiedene Charakteristik. Zu wenig aktiven physiologischen Flüssigkeiten müssen wir normalen Harn, Magensaft, Humor aquaeus und Cerebrospinalflüssigkeit rechnen, zu oberflächenaktiven Flüssigkeiten Serum, defibriniertes Blut, Milch, Speichel und Galle.

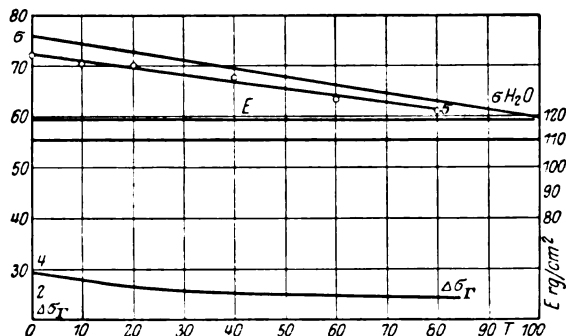


Abb. 2.

$\sigma-t$ Kurve des reinen Wassers.

E — Oberflächenenergie des reinen Wassers.

$\sigma-t$ Kurve des Harns.

E — Oberflächenenergie des Harns.

$(\Delta\sigma)_U$ — Kurve des Harns.

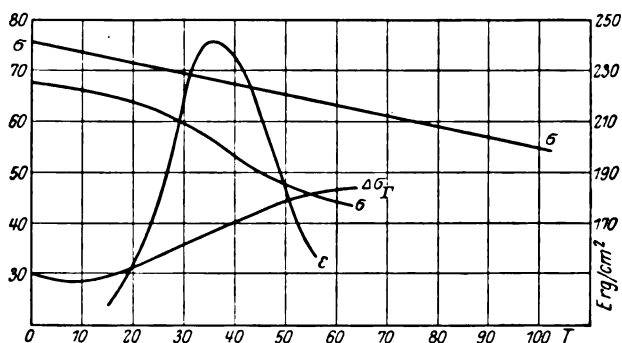


Abb. 3.

$\sigma-t$ Kurve des Serums.

$(\Delta\sigma)_S$ — Kurve des Serums.

E — Oberflächenenergie des Serums.

$\sigma-t$ Kurve des Wassers.

Unter den physiologischen Flüssigkeiten verdient Milch wegen der Veränderung ihrer Oberflächenenergie in Abhängigkeit von der Temperatur eine besondere Beachtung. Wie aus der Tabelle ersichtlich, läßt sich hinsichtlich der Milch bei 60° C ein scharfes, über die Abszissenachse hinausgehendes Abfallen der Kurve der gesamten Oberflächen-

energie beobachten. Mit anderen Worten, in dieser Temperaturzone wird die Größe E von Milch zu Null.

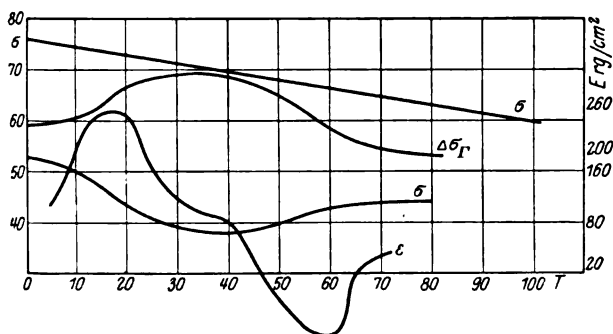


Abb. 4.

σ - t Kurve der Milch.
 σ - Kurve des Wassers.

E — Oberflächenenergie der Milch.
 $(\Delta\sigma)_T$ — Kurve der Milch.

Letzteres weist augenscheinlich darauf hin, daß mit der Milch bei dieser Temperatur eine gewisse innere Veränderung ihrer chemischen Zusammensetzung vor sich geht, wahrscheinlich in Form einer teilweisen Fällung von Casein. In diesem Falle kann die starke Veränderung der gesamten Oberflächenenergie als empfindlicher analytischer Index der gegebenen Veränderung in der Milchezusammensetzung dienen, während die Kurve der Oberflächenspannung selbst in Abhängigkeit von der Temperatur keine scharfen Veränderungen zeigt.

Die Oberflächenaktivität physiologischer Flüssigkeiten kann, wie bereits oben gesagt, nach der Ordinatendifferenz der Oberflächenspannung des Wassers und derjenigen der untersuchten Flüssigkeit bei verschiedenen Temperaturen bestimmt werden, $\Delta\sigma_T = f(T)$ (die Oberflächenaktivität G ist dieser Differenz $\Delta\sigma_T$ für eine Lösung von gegebener konstanter Konzentration proportional).

Betrachten wir eine Reihe der untersuchten physiologischen Flüssigkeiten, so finden wir, daß bei Vorhandensein oberflächenaktiver Eigenschaften $\Delta\sigma_T$ der in ihr bei verschiedenen Temperaturen gelösten Stoffe einer gewissen, ein Maximum aufweisenden Kurve folgt.

Nach dem Charakter der Kurve $\Delta\sigma_T = f(T)$ kann man auf Grund theoretischer Überlegungen nachweisen, daß wir, wenn $\Delta\sigma$ mit der Temperatur ununterbrochen zunimmt, das Vorhandensein eines Maximums von über 100°C voraussetzen müssen, und darum muß die Kurve der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Temperatur jenseits der von uns untersuchten Temperaturgrenzen einen Knick zeigen. Dies muß augenscheinlich bei der Kurve der Oberflächenspannung von Cerebrospinalflüssigkeit und Humor aquaeus

Tabelle I.

Flüssigkeit	T:	0°	10°	20°	40°	60°	80°	100°	Art
Reines Wasser		$\sigma = 75.9$	74.2	72.7	69.45	66.80	62.82	59.60 erg/qcm	
Harn		$\sigma = 72.2$	70.5	70.0	67.5	63.4	61.2	—	Mensch
Magensaft*		$\sigma = 71.1$	69.5	66.8	63.0	58.2	56.0	51.7	Hund
Humor aquaeus oculi		$\sigma = 72.5$	70.65	65.31	57.64	48.2	43.48	—	Ochs
Cerebrospinalflüssigkeit		$\sigma = 67.2$	65.3	62.5	55.25	52.1	—	—	Hund
Galle		$\sigma = 48.74$	47.61	44.07	38.17	35.81	35.53	—	Ochs
Milch		$\sigma = 52.45$	50.19	43.01	38.29	43.01	44.29	—	Kuh
Serum		$\sigma = 67.72$	66.43	63.9	53.29	44.41	—	—	Hund
Defibriertes Blut		$\sigma = 65.14$	63.62	60.73	58.21	45.61	—	—	"
Speichel (parotis)		$\sigma = 70.03$	67.77	61.87	53.51	48.79	46.43	—	"
		$\sigma = 70.03$	65.4	62.2	58.0	54.0	52.8	—	Mensch

Tabelle II.

Flüssigkeit	T:	5°	15°	25°	35°	45°	55°	65°	Art
Reines Wasser		$E = 119$	119	119	119	119	119	119 erg/qcm	
Harn		$E = 111.12$	111.12	111.12	111.12	111.12	111.12	111.12	Mensch
Humor aquaeus		$E = 183.2$	183.2	183.2	183.2	183.2	183.2	183.2	Ochs
Magensaft		$E = 126.6$	126.6	126.6	126.6	126.6	126.6	126.6	Hund
Cerebrospinalflüssigkeit		$E = 148.6$	148.6	148.6	148.6	148.6	148.6	148.6	"
Serum		$E = 95.2$	137.4	181.2	241.4	—	160.2	—	"
Speichel		$E = 122.4$	243.56	208.0	168.96	145.5	131.5	124.0	Ochs
Galle		$E = 74.4$	136.0	171.0	128.0	86.0	60.0	—	Kuh
Milch		$E = 108.1$	251.6	132.4	324.0	—6.7	+ 5.0	—	"

* Magensaft habe ich nach der Methode Prof. J. P. Pavlov's, Speichel des Menschen mittels eines besonderen Trichters nach der Methode N. Kranzporzky erhalten (Arbeiten des II. Allrussischen Physiologenkongresses 1926).

Tabelle III.

Flüssigkeit	T:	0°	10°	20°	40°	60°	80°
Harn	$\Delta \sigma_T =$	3,7	3,2	—	2,0	—	1,4 erg/cm
Humor aquaeus . .	" =	3,4	5,6	7,4	13,2	14,9	18,6 "
Magensaft	" =	4,8	4,8	5,9	6,4	7,9	7,9 "
Milch	" =	23,5	24,0	29,7	31,16	23,1	18,57 "
Speichel	" =	5,40	8,8	10,83	11,45	12,10	10,00 "
Galle	" =	27,16	26,8	28,7	31,28	30,3	27,29 "
Serum	" =	8,2	7,8	8,8	16,22	21,69	— "
Cerebrospinalflüss. .	" =	8,7	8,9	10,5	14,2	15,8*	— "

* Bei 50° C.

der Fall sein, weshalb wir sie als oberflächenaktive Flüssigkeiten annehmen müssen, obgleich bei ihnen $\sigma = f(t)$ von 0 bis 80° C linear abnimmt.

Die Untersuchung physiologischer Flüssigkeiten im Temperaturintervall von 0 bis 100° C bildet eine Reihe Schwierigkeiten. Erstens tritt bei einer Temperaturzunahme bis zu 100° C eine schnelle Verdampfung der Flüssigkeit ein, was die nötigen Ablesungen erschwert. Dieser Nachteil wird durch die Methodik bedeutend beseitigt; die Verdampfung geht in einem kleinen Bläschen vor sich, wobei das Gleichgewicht schnell hergestellt wird. Andererseits erfahren einige physiologische Flüssigkeiten bei Temperaturen über 60° C eine Veränderung ihrer Zusammensetzung; es findet z. B. Ausscheidung von Eiweiß statt, was die Frage über die Umkehrbarkeit der Oberflächenspannungskurve mit der Temperatur aufkommen läßt.

Was die Umkehrbarkeit der Kurven anbetrifft, so muß bemerkt werden, daß sich bei bedeutender Veränderung der Zusammensetzung der Flüssigkeit bei ihrer Erwärmung eine Umkehrbarkeit der Kurve $\sigma - t$ natürlich nicht erwarten läßt. Wo das aber nicht der Fall ist, muß die Umkehrbarkeit der Kurven $\sigma = f(T)$ genau dieselbe sein, wie bei Lösungen chemisch reiner Stoffe. Die Nichtumkehrbarkeit im ersten Falle muß ebenfalls für den Charakter der in der Flüssigkeit vorhandenen oberflächenaktiven Stoffe sprechen. Der Verlauf von σ und E mit der Temperatur gewährt außerdem die Möglichkeit, die Veränderungen, welche im System vor sich gehen und die durch keine andere analytische Methode zu bestimmen sind, zu verfolgen.

Endlich ist der Charakter der Kurven der gesamten Oberflächenenergie, die wir auf Grund unserer Versuche erhalten haben, der Kurven E für Lösungen chemisch reiner Stoffe analog, was ebenfalls für die Gesetzmäßigkeit der untersuchten Oberflächenerscheinungen bei physiologischen Flüssigkeiten spricht.

Ich bin der Ansicht, daß die Untersuchung der Oberflächeneigenschaften physiologischer Flüssigkeiten, der gesamten Oberflächen-

energie, der Oberflächenspannung bei verschiedenen Temperaturen und der Adsorption ebenfalls eine analytische Methode zur Beurteilung eventueller Veränderungen, im Molekularzustande dieser Flüssigkeiten darstellt. Was die pathologischen Flüssigkeiten betrifft, so werden sie von mir und meinen Kollegen bereits untersucht und finden ihre völlige Bestätigung.

Zusammenfassung.

1. Sämtliche physiologische Flüssigkeiten lassen sich in zwei Gruppen einteilen: 1. in oberflächeninaktive Flüssigkeiten (Harn, Magensaft) und 2. in oberflächenaktive Flüssigkeiten (Blut, Milch, Galle, Speichel). In der Mitte stehen Humor aquaeus und Cerebrospinalflüssigkeit, bei denen die Oberflächenspannung mit der Temperatur linear abnimmt; $\Delta\sigma_r = f(T)$ jedoch nimmt bei ihnen ununterbrochen zu und wird bei $t > 100^\circ \text{C}$ ein Maximum haben.

2. Die gesamte Oberflächenenergie oberflächenaktiver, physiologischer Flüssigkeiten hat bei einer bestimmten Temperatur ein Maximum; bei wenig oberflächenaktiven Flüssigkeiten ändert sich die gesamte Oberflächenenergie mit der Temperatur nicht ($\frac{\partial E}{\partial T} = 0$).

3. Die Oberflächenspannung wenig oberflächenaktiver physiologischer Flüssigkeiten nimmt mit der Temperatur linear ab; bei oberflächenaktiven physiologischen Flüssigkeiten aber ändert sich die Oberflächenspannung mit der Temperatur nach einer typischen Kurve.

4. Die gesamte Oberflächenenergie der Milch zeigt bei 60°C einen schroffen Anstieg.

5. Der Charakter der Kurven $\sigma = f(T)$ und $E = f(T)$ ist bei den von mir untersuchten physiologischen Flüssigkeiten den für Lösungen chemisch reiner Stoffe erhaltenen Kurven völlig analog.

6. Die untersuchten Oberflächenerscheinungen physiologischer Flüssigkeiten stellen eine analytische Methode sowohl zur Bestimmung der Oberflächeneigenschaften von Flüssigkeiten wie auch zur Beurteilung des Charakters ihrer eventuellen Veränderungen dar.

7. Eine Bestimmung der Oberflächenspannung physiologischer Flüssigkeiten nur bei einer Temperatur (bei etwa 20°C) kann die Oberflächeneigenschaften dieser Flüssigkeiten nicht vollkommen charakterisieren.

Zur Methodik der Chininbestimmung nach dem Verfahren von Hartmann und Zila.

Von

J. A. Smorodinzew und A. N. Adowa.

(Aus der chemo-therapeutischen Abteilung des Tropeninstituts des Volkskommissariats für Gesundheitswesen in Moskau.)

(Eingegangen am 13. Juni 1927.)

Das Chinin kann auf zweifachem Wege aus zusammengesetzten Gemischen abgesondert werden: durch Fällung in Form eines unlöslichen Niederschlags oder durch Extraktion mit einem passenden Lösungsmittel. Als gutes Lösungsmittel für Chinin ist noch von *Liebig* Äther vorgeschlagen worden. Aber wie es kein spezielles Fällungsmittel¹ für Chinin gibt, so zieht auch jedes Lösungsmittel außer dem Chinin auch andere Stoffe aus. Diese Umstände machen Schwierigkeiten bei der Ausarbeitung einer guten Methode der quantitativen Chininbestimmung in den Auszügen von Tier- und Pflanzengewebe.

Von den Methoden, bei denen zur Extraktion des Chinins Äther angewandt wird, ist als genau das von *H. H. Meyer* vorgeschlagene, von *Hartmann* und *Zila*² beschriebene Verfahren angenommen. Anscheinend ist diese Methode von ihrem Verfasser nicht beschrieben worden, jedenfalls gelang es uns nirgends, Angaben darüber zu finden.

Das Verfahren von *H. H. Meyer* beruht auf der Ausfällung des Chinins mittels Tannin und der nachfolgenden Extraktion des freien Alkaloids mit Äther und stellt eine Kombination der von verschiedenen Verfassern früher vorgeschlagenen Methoden dar. Die Ausfällung durch Tannin wurde zuerst von *Quevenne*³ für die Ausscheidung des

¹ J. A. Smorodinzew, Die Methoden der quantitativen Bestimmung des Chinins, Russ. Journ. of trop. medicin 1926, Nr. 1, S. 21.

² H. Hartmann und L. Zila, Münch. med. Wochenschr. 64, 1597, 1917; Arch. f. exper. Pathol. 88, 221, 1918.

³ Quevenne, Journ. de chim. med. [2] 4, 460, 1838.

Chinins aus dem Urin vorgeschlagen, später wurde diese Methode von *Vial*¹, *Kerner*², *Lefort*³, *Personne*⁴ u. a. benutzt.

Selbstverständlich schlägt das Tannin mit dem Chinin noch viele andere Stoffe (Erdalkalien, organische Basen, Pigmente) nieder und man erzielt andererseits keine völlige Ausscheidung des Chinins, wenn in der Lösung neutrale Chininsalze vorhanden sind². Die Ausziehung des Chinins mittels Äther wurde von *Liebig*, dann von *Zimmer*⁵, *Dragendorff*⁶, *Salkowski*⁷, *Vitali*⁸, *Giemsa*⁹ und vielen anderen angewandt.

Um diese Verfahren der Chininausscheidung zu prüfen, haben *Hartmann* und *Zila* nur eine Analyse des normalen Harns unter Zusatz von 0,005 g Chininum hydrochloricum ausgeführt; in einer Hälfte entdeckten sie 0,0049 g (98 %), in der zweiten 0,0054 g (108 %) und fanden diese Angaben für genügend, um nachfolgend 2000 Harnanalysen nach dieser Methode auszuführen.

Der Methode dieser Verfasser folgend, konnte *Becker*¹⁰ im Serum des Pferdes und Kaninchens ein Chinindefizit von 30 bis 64 % feststellen, während *Neuschlosz*¹¹ aus dem Harn nur 13 bis 65 % des hinzugesetzten Chinins zurückbekommen konnte.

Die Verfasser, die sich der Methode von *H. H. Meyer* bedienten, stellten keine Versuche weder mit Harn ohne Chinin noch mit wässrigen Lösungen des Alkaloids an.

Um diese sehr wichtige Lücke auszufüllen, führten wir eine Reihe von Bestimmungen nach *Hartmann* und *Zila* mit reinen Reagenzien ohne Chinin, mit wässriger Chininlösung, mit dem Harn von Patienten, welche kein Chinin bekommen hatten, und mit dem Harn bei Hinzufügung von Chinin aus.

¹ *Vial*, Chem. pharm. Centralbl. 1853, S. 160.

² *G. Kerner*, Pflügers Arch. 2, 200, 1869.

³ *J. Lefort*, Journ. de pharm. chim. [4] 9, 170, 241, 1869.

⁴ *Personne*, Journ. de chim. pharm. 28, 354, 1878.

⁵ *C. Zimmer*, *Hartung* und *Schwarzkopf*, Chem. d. organ. Alkali, S. 232. München 1855.

⁶ *G. Dragendorff*, Pharm. Zeitschr. f. Rußland 1857, H. 10; Zeitschr. f. analyt. Chem. 7, 521, 1868.

⁷ *E. Salkowski*, Centralbl. f. med. Wissensch. 12, 718, 1874.

⁸ *Vitali*, Journ. de chim. med. 1874, S. 210.

⁹ *G. Giemsa* und *H. Schaumann*, Arch. Sch. u. Tr. Hyg., Beih. 3, 1907, S. 130.

¹⁰ *E. Becker*, diese Zeitschr. 103, 63, 1920.

¹¹ *S. M. Neuschlosz*, Pflügers Arch. 184, 190, 1920.

Bestimmungsmethode.

200 ccm Harn werden mit 5 ccm 2 n $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ alkalisiert, darauf werden 15 ccm n MgSO_4 zugesetzt und mit 5 ccm 10%igen Tannins ausgefällt. Der Chinin enthaltende Niederschlag wird abfiltriert, quantitativ in eine Schale übergeführt, im Wasserbad mit 5 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ im Verlauf von 30 Minuten zersetzt und die heiße Lösung filtriert. Der Niederschlag auf dem Filter wird mit heißem Ammoniakwasser bis zur völligen Chininentfernung ausgewaschen. Nach der Abkühlung wird das Filtrat mit 100 ccm Äther geschüttelt; 50 ccm des Ätherauszugs werden abgedampft, getrocknet bei 100° und gewogen. Das ermittelte Gewicht soll den Gehalt an Chinin in 100 ccm der Ausgangsflüssigkeit ergeben.

a) Um festzustellen, ob die *Reagenzien* selbst im Verfahren von *Hartmann* und *Zila* eine Gewichtszunahme geben können, führten wir alle diese Prozeduren mit reinem Wasser statt Harn oder einer wässrigen Chininlösung aus:

1. Nach Abdampfen von 50 ccm Äther 0,0000 g Rückstand
2. „ „ „ 50 „ „ 0,0000 g „

d. h. die Reagenzien selbst beeinflussen die Ergebnisse der Analyse nicht.

b) Bei *wässriger Chininlösung* ergibt diese Methode fast quantitative Resultate:

Nr.	Zugesetzt g	Freies Alkaloid gefunden g	Berechnet auf salzsaures Chinin g	Differenz g
1	0,005	0,0044	0,0054	+ 0,0004
2	0,005	0,0048	0,0058	+ 0,0008

c) Ausscheidung von „Chinin“ von chininfreiem Harn.

Nr. der Bestimmung	Gewicht des Niederschlags g	Nr. der Bestimmung	Gewicht des Niederschlags g
1	0,0040	12	0,0042
2	0,0036	13	0,0042
3	0,0041	14	0,0058
4	0,0034	15	0,0046
5	0,0042	16	0,0044
6	0,0030	17	0,0058
7	0,0033		
8	0,0044		
9	0,0034		
10	0,0028		
11	0,0030		
		Durchschnitt:	0,0040
		Auf Chininum hydrochloricum berechnet:	0,00489

Unsere Versuche ergaben, daß der Trockenrückstand des Ätherauszugs von wirklich chininfreiem Harn zwischen 0,0028 und 0,0058 g — im Durchschnitt 0,00489 g — schwankt. Auf diese Weise nähert sich

die absolute Größe des Durchschnittsgewichts, der Rückstand des chininlosen Harns sehr den Zahlen des Grundversuchs von *Hartmann* und *Zila* mit Harn, dem 5 mg Chininum hydrochloricum zugesetzt waren, an.

d) Bei Hinzufügung von Chinin zum Harn fanden wir immer mehr Chinin als wir hinzugefügt haben.

Nr	Zugesetzt g	Freies Alkaloid gefunden g	Berechnet auf salzsaures Chinin g	Differenz g
1	0,005	0,0064	0,0078	+ 0,0028
2	0,005	0,0070	0,0086	+ 0,0036

Auf Grund unserer Versuche ist die Methode von *Hartmann* und *Zila* nur (in gewissem Maße) für wässrige Chininlösungen anwendbar. Für die Chininbestimmung im Harn ist diese Methode völlig unbrauchbar, und trotzdem bedienen sich dieser Methode viele Verfasser zur Bestimmung des Chinins im Harn, oder sie benutzten die „genaue Methode“ von *Hartmann* und *Zila* zur Prüfung der von ihnen angewandten Verfahren.

Betreffs der Methodik selbst können folgende Bemerkungen gemacht werden:

1. Nach dem Zusatz von 5 ccm 2 n $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ bleibt die Reaktion des Harns in den meisten untersuchten Fällen noch auf Lackmus sauer (nach *Hartmann* und *Zila* muß sie dabei alkalisch werden).

2. Nach Hinzufügung des Tannins fällt ein Niederschlag in verschiedener Menge aus; an Pigment reicher Harn ergibt einen reichlicheren Niederschlag.

3. Beim Stehen bleibt das Tanninfiltrat in vereinzelt Fällen durchsichtig, gewöhnlich aber trübt es sich und scheidet wiederum einen Niederschlag aus.

4. Nach Schüttelung mit Äther geht ein mehr oder weniger großer Teil des Äthers (15 bis 20 ccm) in die Lösung über, und nach der Extraktion macht die Ätherschicht bereits nur 80 bis 85 ccm anstatt 100 ccm aus. Für die Abdampfung werden aber immer gewöhnlich 50 ccm genommen.

5. Die Menge des nach dieser Methode bestimmten Chinins entspricht nicht 100 ccm Harn, sondern einer größeren Menge.

6. Die Methode ist sehr zeitraubend, die Bestimmung dauert etwa 3 Stunden.

Schlußfolgerungen.

1. Das Verfahren von *Hartmann* und *Zila* wird mit Unrecht den „genauen“ Bestimmungsmethoden des Chinins im Harn zugerechnet.

2. Normaler, chininfreier Harn ergibt einen Niederschlag, der nicht vernachlässigt werden kann.

3. Die Prozedur der Chininausscheidung ist zu kompliziert, zeitraubend und besitzt keine Vorzüge vor der einfachen Ausziehung des Chinins mit Äther.

4. Die Einzelheiten der Methode sind schwach ausgearbeitet und die Methode ist von den Verfassern, die sie vorgeschlagen haben, gänzlich unbegründet.

5. Die Löslichkeit des Äthers im Wasser führt zu einer scheinbaren größeren Chininausbeute, als es in Wirklichkeit ist.

6. Die Gewichtszunahme bei dieser Methode wird durch die Beimengung nebenseitiger Stoffe und durch die teilweise Wasserlöslichkeit des Äthers verursacht.

7. Das Chinindefizit bei manchen Verfassern konnte auf dem unvollständigen Ausfällen des Chinins durch das Tannin und dem ungenügenden Auswaschen des Tanninniederschlags beruhen.

**Zur Methodik
der Katalasebestimmung im Blute und in den Tiergeweben.**

Von
E. Gagarina.

(Eingegangen am 6. Juli 1927.)

Die in dieser Zeitschr. 185, 63, 1927 unter dem Titel „Zur Methodik der Bestimmung des Blutkatalasegehalts“ veröffentlichte Mitteilung von *Golzow* und *Jankowsky* stellt im großen und ganzen eine Wiederholung eines Teiles der Arbeit dar, die ich gemeinsam mit Herrn *W. Jankowsky* unter Leitung und im Laboratorium von Prof. *L. Stern* seit fast 2 Jahren ausführe. Alle von *Golzow* und *Jankowsky* angegebenen methodischen Einzelheiten und Schlußfolgerungen sind bereits im ersten Teile unserer im Journ. d. exper. Biol. u. Med. 7, 33, 1926 erschienenen Arbeit enthalten.

CO₂- und O₂-Analysen mit dem Haldaneapparat mittels automatischer Schwenkung.

Von
Gerh. Gmeiner.

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik, Leipzig.)

(Eingegangen am 7. Juli 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Zur Analyse von Gasgemischen auf O₂ und CO₂ bedient man sich vorzugsweise der Apparate von *Haldane* und des auf demselben Prinzip beruhenden Apparates von *Carpenter*.

Jede Analyse erfordert mit dieser Apparatur ein vielmaliges, zeitraubendes Schwenken eines Quecksilbergefäßes; dieses Schwenken muß sehr genau und gleichmäßig ausgeführt werden; die geringste Abweichung in der Bewegung nach oben oder unten zerstört die Analyse und damit oft einen ganzen stundenlangen Versuch; außerdem ist nach einem derartigen Mißgeschick eine sehr zeitraubende Reinigung des Apparates notwendig.

Der Gedanke, eine maschinenmäßige Arbeit auch auf eine Maschine abzuwälzen, ist also sehr naheliegend.

Das Heben und Senken des Quecksilbergefäßes kann durch eine rotierende Bewegung ersetzt werden; das Gefäß wird dazu an einen hebelartigen Arm gehängt. Die Höhe der Schwenkung läßt sich durch die gewählte Entfernung des Aufhängepunktes vom Drehungsmittelpunkte bestimmen. Aus diesen Grundlinien ist die Konstruktion des ganzen Schwenkapparates abzuleiten. Bei dem Apparat (Abb. 1 und 3) sind 3 Hauptteile zu unterscheiden:

1. Der auf einer Achse aufmontierte Arm *A*, der einen beweglichen Läufer mit Öse trägt (*L*), in welcher das Quecksilbergefäß aufgehängt wird.

2. Ein Gestell zur Lagerung der Achse und Einstellung ihrer Höhe zum Haldane-Apparat.

3. Der Motor (M), der durch Treibriemen und Schneckenübertragung die Achse in Drehung versetzt und durch verschiedene Wahl des Widerstandes und der Übersetzung ($\dot{U}$) eine Regulierung der Schwenkgeschwindigkeit erlaubt.

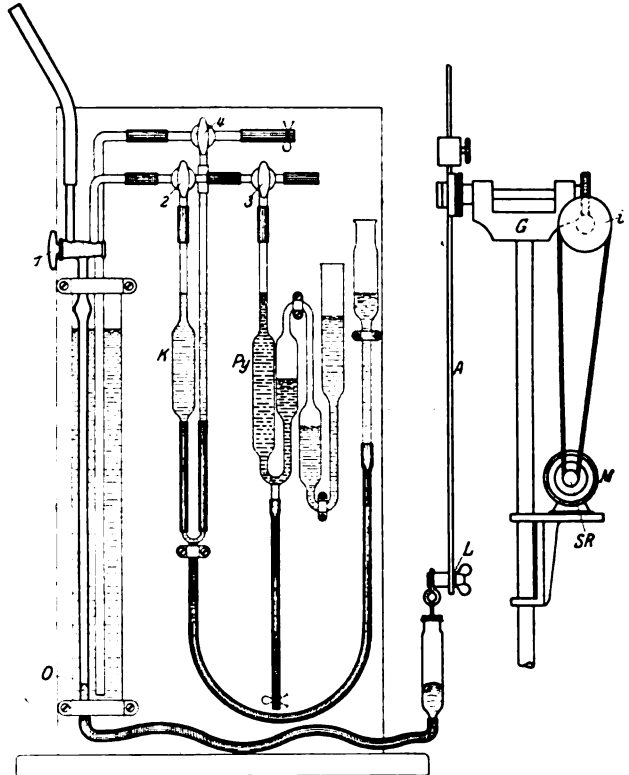


Abb. 1. Einstellung des Θ -Punktes.

Der hier verwandte Haldaneapparat hat eine Bürettenteilung von 0 (unten) bis 2,5 cm. Jede Analyse wird begonnen, indem erst der Quecksilbermaniskus auf den Nullpunkt eingestellt wird und darauf der Spiegel der Kalilauge durch einen Schieber markiert wird. Diese Einstellung hat den großen Vorteil, daß die analysierten Kubikzentimeter CO_2 und O_2 sogleich ohne Umrechnung abgelesen werden können.

Der Apparat soll aber noch eine weitere Anforderung erfüllen. Er soll nicht nur durch Heben und Senken des Quecksilbergeäßes den Haldaneapparat automatisch bedienen, er soll auch eine genaue Einstellung des Quecksilbermaniskus in der Bürette ermöglichen, *ohne* daß ein Umhängen des Quecksilbergeäßes nötig wird, da eine derartige Manipulation sehr leicht durch ungeeignete Bewegungen zu

einem Hochschnellen der Kalilauge in den Glashahn führen kann, wodurch dann die Analyse verdorben ist.

Der von *P. Martini* und *A. Pierach* veröffentlichte Schwenkapparat läßt diese Gefahrenquelle vollkommen offen, denn er erfordert im Laufe einer Untersuchung ein mehrmaliges Umhängen des Quecksilbergefaßes von *Haldane* auf die rotierende Schwenkvorrichtung; und dabei ist die Gefahr eines Mißgeschickes sehr groß.

Um dieses Umhängen bei der Nullpunkteinstellung und bei der Ablesung zu vermeiden, ist der Schwenkarm *A* so lang gewählt, daß bei vertikaler Armstellung der Läufer mit dem Quecksilbergefaß so tiefgeführt werden kann, daß der Quecksilbermaniskus in der Bürette am Nullpunkt steht.

Anwendung des Apparats.

I. Die Einstellung zum Haldaneapparat bleibt dann für alle Analysen unverändert. Dazu gehört:

1. Feststellung der Achsenhöhe.
2. Ermittlung der äußersten Grenze jeder Schwenkung, so daß Kalilauge und Pyrogallol nicht in die Glashähne schnellen.
3. Erprobung der günstigsten Schwenkungsgeschwindigkeit (Regulierung durch Übersetzung und Lampenwiderstand).
4. Bestimmung der zur Nullpunkteinstellung notwendigen Armlänge.

Zu 1. Zur Feststellung der richtigen Achsenhöhe stellen wir den Schwenkarm horizontal und führen den Läufer dicht an den Achsenkopf; hängen wir jetzt das Quecksilbergefaß des Haldaneapparats ein, so soll der Quecksilbermaniskus etwa in der Mitte der Glaskugel der Haldanebürette stehen.

Zu 2. Die Schwenkungshöhe wird ermittelt: Ist der Arm vertikal gestellt und befindet sich das Quecksilbergefaß im höchsten Punkt seines Kreislaufes, so soll das Quecksilber in der Bürette dicht bis zum Hahn 1 (Abb. 1) steigen; drehen wir 180° weiter, so soll der Quecksilbermaniskus in der Bürette nicht viel unterhalb der Bürettenkugel stehen und die Kalilauge im Absorptionsgefäß (*K*) gerade bis zur Kapillarenmündung steigen.

Zu 3. Die Schwenkungsgeschwindigkeit kann durch das gewählte Übersetzungsverhältnis und durch Einschalten eines Lampenwiderstandes reguliert werden. Es ist anzustreben, den Motor so langsam wie möglich laufen zu lassen, da er dann am ruhigsten läuft; das optimale Verhältnis zwischen Übersetzung und eingeschaltetem Widerstand muß durch Probieren gefunden werden.

Im Beginn lasse man lieber zu schnell schwenken, da dann die Gefahr, daß Lauge in die Glashähne tritt, geringer ist, weil bei schnellerer Umdrehung jede Schwenkbewegung nicht zur vollen Auswirkung kommt.

Zu 4. Der Arm ist im Achsenmittelpunkt verstellbar angeordnet und wird mit der Schraube *S* (Abb. 2) festgestellt, so daß der Schwenkapparat jedem Haldaneapparat angepaßt werden kann. Die richtige Armlänge

ist erreicht, wenn bei vertikal gestelltem Arm das Quecksilbergefaß gerade so tief hängt, daß der Hg-Meniskus in der Bürette am Nullpunkt der Bürettenskala steht. Ist der Schwenkapparat einmal in dieser Weise zum Haldaneapparat eingestellt, so bleiben diese fixierten Einstellungen bei allen Analysen unverändert.

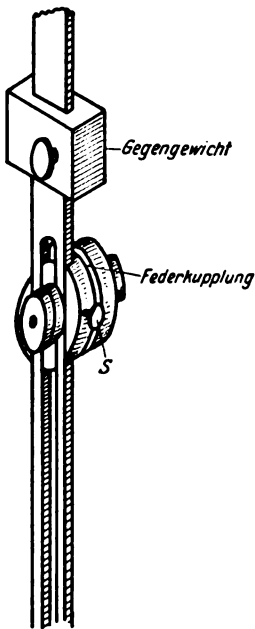


Abb. 2.

[Die hier angegebenen Bewegungen des Schwenkarmes können ohne Anstellen des Motors gleich mit der Hand ausgeführt werden, da der Schwenkarm mit der Achse nicht starr, sondern durch ein *Feder-Adhäsionsgelenk* verbunden ist (Abb. 2).]

II. Die Ausführung einer Analyse:

Nachdem in der üblichen Weise das zu untersuchende Gasgemisch in die Bürette eingefüllt ist, wird die Apparatur die in Abb. 1 skizzierte Stellung einnehmen. Das Quecksilbergefaß wird im tiefsten Punkt des vertikal gestellten Schwenkarmes hängen (Nullpunkteinstellung).

Die Feineinstellung des Quecksilbermaniskus in der Bürette wird so vorgenommen, daß man das Schwungrad des Motors *SR* (Abb. 1) als Steuerrad benutzt und durch vorsichtiges Drehen ein Steigen oder Fallen des Hg-Meniskus erreicht, bis er auf die gewünschte Markierung eingestellt ist.

Die weiteren Handgriffe einer Analyse sind folgende:

1. Bürette mit der Kalilauge verbinden, Läufer zentral verschieben, Motor anstellen.
2. Nach genügender Schwenkung Motor abstellen, wenn Schwenkarm wagerecht steht (sonst schießt Kalilauge in den Glashahn). Läufer peripher verschieben und Schwenkarm senken (Feineinstellung durch Schwungrad des Motors), bis Kalilauge an der Marke steht; ablesen.
3. Den Haldaneapparat auf Pyrogallol umstellen, Läufer zentral verschieben, Motor anstellen usw.

III. Die Vorteile der automatischen Schwenkung sind:

1. Es wird Zeit gespart. Der Untersucher kann, während der Apparat automatisch schwenkt, andere Arbeiten in Angriff nehmen. Eine Beaufsichtigung während des Laufens erfordert der Apparat nicht.
2. Es wird unnötige Arbeit gespart. Bei *richtiger Handhabung* des Apparates ist die Gefahr, daß Kalilauge oder Pyrogallol in die Glashähne schnellte und die Analyse und Apparatur verdirbt, ganz ausgeschaltet, denn das Quecksilbergefaß bleibt unverändert am Läufer

des Schwenkarmes hängen. Jede ausfahrende, gefährliche Bewegung mit dem Quecksilbergefaß ist unmöglich, da die Bewegungen durch Läufer und Schwenkarm begrenzt und vorgeschrieben sind.

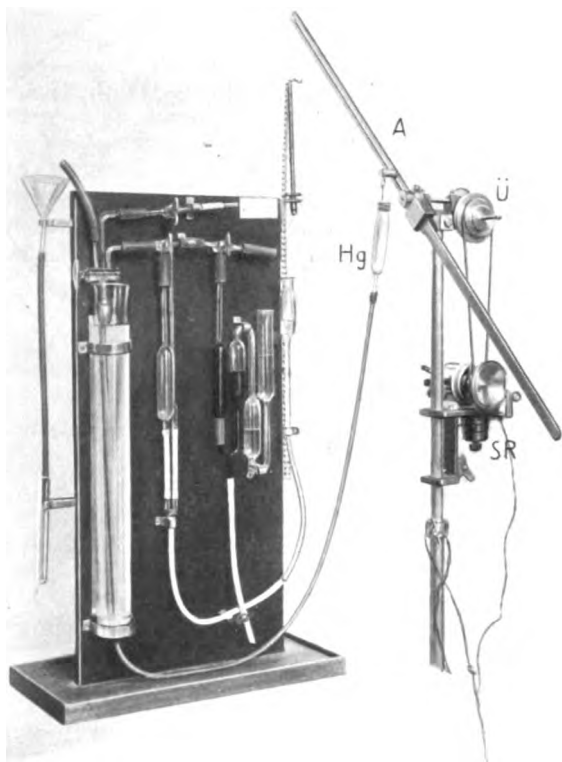


Abb. 3. Apparat im Betrieb.

Es werden nicht nur unnötige, zeitraubende Reinigungsarbeiten gespart, sondern das oft so ärgerliche Fehlschlagen einer wichtigen Untersuchung wird ebenfalls sicher vermieden.

Der Apparat ist in hiesiger Klinik seit einem halben Jahre in Betrieb und hat sich gut bewährt.

Der beschriebene Apparat ist für die Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft nach unseren Angaben von der Firma Zimmermann, Leipzig-Stötteritz, Wasserthurmstraße, gebaut worden und der Klinik von der Notgemeinschaft zur Verfügung gestellt worden, wofür wir ihr zu besonderem Danke verpflichtet sind.

Beitrag zur Reinigung der Malzamyrase.

Von

E. Glimm und W. Sommer.

(Mitteilung aus dem Laboratorium für Nahrungsmittelchemie und landwirtschaftliche Gewerbe der Technischen Hochschule zu Danzig.)

(Eingegangen am 7. Juli 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Theoretischer Teil.

Versuche, die Malzamyrase in reiner Form darzustellen, sind in den letzten Jahren mehrfach unternommen worden.

Eine zusammenfassende Darstellung über die bisherigen Versuche gaben kürzlich *Lüers* und *Sellner* (1). Ihnen selbst war die Reinigung der Malzamyrase durch Benutzung der *Willstätterschen* Adsorptionsmethode weitgehend geglückt. Sie konnten mit Aluminiumhydroxyd die Amylase zum größten Teile absorbieren und die Elution aus dem Absorbat durch Wasser bewirken, durch das ein kräftiger Kohlensäurestrom geleitet wurde. Noch bessere Resultate erzielten sie durch Elution mit einer Lösung, die zu gleichen Teilen aus m/15 sekundärem Natriumphosphat und primärem Kaliumphosphat bestand. Alle Operationen wurden bei möglichst niedriger Temperatur ausgeführt. Durch zweimalige Absorption an Tonerde und Eluieren mit der Phosphatlösung stieg das Fermentvermögen der Würze auf annähernd das Hundertfache.

Die Analyse des reinsten Präparats von *Lüers* und *Sellner* hatte folgendes Resultat:

Der absolute Amylasenwert betrug etwa	1,6 ‰
Proteingehalt: im Ausgangspräparat	42,99 ‰
„ Reinpräparat	74,4 ‰
Kohlehydratgehalt: im Ausgangspräparat	43,56 ‰
„ Reinpräparat	28,07 ‰

Es fällt besonders das Steigen des Proteingehalts mit der steigenden Reinheit der Amylase auf. Trotzdem will *Lüers* bis zum Vorliegen neuer Resultate die Amylase noch nicht zu den Eiweißkörpern in unmittelbare Beziehung setzen. Er erinnert an die Befunde *Willstätters*, dessen hochaktive Präparate aus Pankreas keine Eiweißreaktion mehr gaben und negativ auf Aminosäuren und Kohlehydrate reagierten.

Die Kinetik der diastatischen Stärkehydrolyse wurde sehr genau in den mit Malzenzym ausgeführten Arbeiten von *H. v. Euler* und *O. Svanberg* (2) untersucht. Es zeigte sich, daß die Reaktionskonstante einen scharfen

Knick bekommt, wenn 0,75 g Maltose aus 1 g Stärke, d. i. 71 % der theoretischen Menge entstanden ist. Daher ist bei der Berechnung der Reaktionskonstante bei Anwendung von 1 g Stärke 0,75 g Maltose als Anfangskonzentration zu setzen. Bei Malzamylose wurde von *Lüers* und *W. Wasmund* (3) bis zu einem Umsatz von 50 % Proportionalität von Reaktionsdauer und gebildeter Maltose gefunden.

Auf Grund der genauen Proportionalität zwischen Reaktionskonstante und Enzymmenge hat *Willstätter* als Maß für die Menge und Konzentration der Amylase den Begriff der Amylaseeinheit (Am. E.) eingeführt und versteht darunter den hundertfachen Betrag derjenigen Enzymmenge, die beim Stärkeabbau unter festgelegten Bedingungen die Reaktionskonstante 0,01 ergibt (4). Bei einer molekularen Reaktion berechnet sich die Reaktionskonstante k nach der Formel:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}.$$

t bedeutet in der Formel die Reaktionszeit, a die Anfangs- und x die Endkonzentration, $a - x$ die zur Zeit t noch vorhandene Substratkonzentration.

Den enzymatischen Reinheitsgrad eines Präparats drückt nach *Willstätter* der Amylasewert (Am. W.) aus, d. h. die Anzahl der Am. E. in 0,01 g Substanz.

$$\text{Am. W.} = \frac{\text{Am. E.} \cdot 0,01}{\text{g Trockensubstanz}} = \frac{k \cdot 0,01}{\text{T. S.}}$$

Euler (5) hatte vorher eine etwas andere Einheit aufgestellt. Auch er lehnt mit seiner Einheit an die Reaktionskonstante an und bezeichnet als Ver-zuckerungsvermögen (Vz. F.):

$$\text{Vz. F.} = \frac{k \cdot \text{Maltose}}{\text{T. S.}}$$

Hier bedeutet k wieder die Reaktionskonstante, g = g Maltose der im Grenzabbau verzuckerungsfähigen Stärke.

Experimenteller Teil.

Arbeitsmethode.

Die Versuche wurden angestellt mit Diastase *Merck*. Als Substrat diente „lösliche Stärke“ *Kahlbaum*. Die Bereitung der Diastaselösung erfolgte durch Anreiben des Pulvers mit etwas Wasser, Auffüllen auf ein bestimmtes Volumen und Filtration. Die Stärkelösung war stets 2 %ig, auf nicht getrocknete Stärke berechnet.

Ein sternförmiges Reagenzglasgestell, das sich in einem geräumigen Wasserbad befand, wurde mit einer Anzahl Reagenzgläser besetzt. Die Temperatur wurde durch ein angehängtes Thermometer kontrolliert. Die Festlegung der optimalen $p_H = 5$ erfolgte durch Zugabe einer Phosphatpuffermischung. Als Puffermischung wurde verwendet:

m/15 sekundäres Natriumphosphat (11,876 g auf 1 Liter),

m/15 primäres Kaliumphosphat (9,178 g auf 1 Liter).

Mischungsverhältnis 0,05 cem sekundäres Phosphat + 9,95 cem primäres Phosphat.

Als Indikator wurde Methylrot benutzt.

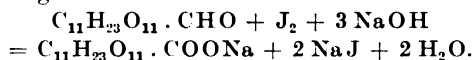
Eine besondere Aktivierung durch Phosphatpuffer im Gegensatz zum Acetatpuffer wurde in den Versuchen nicht beobachtet.

Nach bestimmten Zeiten wurde die Reaktion zur Feststellung der gebildeten Maltose sistiert durch Zugabe von 3 Tropfen 34 %iger Natronlauge und die gebildete Maltose bestimmt. In jedes Reagenzröhrchen wurde der Reihe nach einpipettiert:

1. Stärkelösung, 2 %ige (Rohpräparat) 10 ccm
 2. Puffermischung x_1 „
 3. Enzymlösung (entsprechend 5 mg Rohpräparat) x_2 „
- Gesamtvolumen 20 ccm

Das Volumen der Pufferlösung betrug also stets $x_1 = 20 - (10 + x_2)$ ccm.

Die Titration des Zuckers erfolgte nach der Hypojoditmethode von R. Willstätter und G. Schudel (6). Die Reaktion geht für Maltose nach folgender Gleichung vor sich:



Es entspricht 1 ccm n/10 Jodlösung = 18 mg Maltose. Nach Sistierung der Reaktion mit Natronlauge wurden aus jedem Reagenzglas 10 ccm herauspipettiert, mit 20 ccm n/10 Natronlauge und 10 ccm n/10 Jodlösung versetzt und der Reihenfolge nach die verbrauchte Menge Jodlösung nach 10 Minuten durch Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure und Zurücktitrieren mit n/10 Thiosulfatlösung bestimmt.

Zur Bestimmung des Leerverbrauchs der alkalischen Jodlösung durch Proteine, Zucker, Alkohol usw. wurde jedesmal ein blinder Versuch angesetzt (in den Tabellen unter Min. 0 angegeben). Der Wert für verbrauchte Kubikzentimeter n/10 Thiosulfatlösung nach „0 Minuten“ entspricht dem Titer der alkalischen Jodlösung nach Abzug des Leerverbrauchs.

Zur Prüfung der Amylasepräparate auf niedere *Eiweißstoffe* wurde die Reaktion mit Triketohydrindenhydrat benutzt. Aminosäuren, welche eine freie Aminogruppe und eine freie Carboxylgruppe besitzen, geben mit Triketohydrindenhydrat eine Blaufärbung. Polypeptide, Peptone und Eiweißstoffe verhalten sich zum Teil ebenfalls positiv. Die Empfindlichkeit der Reaktion ist für Alanin 1 : 26000.

Schwach alkalische Reaktion verhindert die Reaktion. Deshalb erfolgte die Prüfung der alkalischen Elutionen erst nach Ansäuern mit n/10 Essigsäure (Lackmusrot). Die Kochdauer betrug mindestens 10 Minuten.

Vorversuche.

Untersuchung der käuflichen Diastase.

Zur Untersuchung der wässerigen Auszüge der Diastasepräparate wurde je 1 g Präparat zu 100 ccm Wasser gelöst und im Filtrat die Trockensubstanz, der Stickstoff nach Kjeldahl und die Kohlehydrate nach Soxhlet bestimmt. In der folgenden Tabelle geben wir die Resultate, die wir bei der Analyse von drei Präparaten (Merck) gewannen.

Diastase	Trockensubstanz in 100 ccm Lösung	% N der Trockensubstanz	% Kohlehydrate (als Maltose) der Trockensubstanz
I	0,642	6,5	5,6
II	0,646	5,5	7,3
III	0,846	8,8	8,5

Einfluß des Alkohols auf die Aktivität der Amylase.

Um die Abbaufähigkeit von Diastase in alkoholischer Lösung gegenüber löslicher Stärke feststellen zu können, mußte die Konzentration des Alkohols so gewählt werden, daß die Stärke noch nicht ausflockte. Eine Mischung von 700 Teilen 96 vol.-%igem Alkohol mit 500 Teilen Wasser rief, mit der gleichen Volumenmenge 2 %iger löslicher Stärkelösung (*Kahlbaum*) versetzt, noch keine Fällung nach 24stündigem Stehen hervor. Je 1 ccm 0,5 %ige Diastaselösung, 8 ccm 50 vol.-%iger Alkohol wirkten in der üblichen Weise auf 10 ccm Stärkelösung nach Zusatz von 1 ccm Phosphatmischung ein. Die Werte sind in der Kurve Abb 1 graphisch dargestellt. Auf der Abszisse sind die Zeiten in Minuten aufgetragen, auf der Ordinate befinden sich die Werte für die zugehörigen verbrauchten Kubikzentimeter $n/10$ Jodlösung, die der gebildeten Maltosemenge entsprechen. Die Kurve zeigt gegen Ende eine Hemmung. Der experimentell ermittelte Grenzzabbau in wässriger Lösung = 3,6 ccm $n/10$ J stimmt mit dem Extrapolationswert der Kurve 1a überein. Berechnet auf diesen Grenzzabbau = 3,6 ccm $n/10$ J, zeigt die Amylase in 50 vol.-%iger alkoholischer Lösung für 21 Minuten die Reaktionskonstante $k_2 = (1/21 \log 3,6/1,5) = 0,0181$. Für die wässrige Diastaselösung gleicher Konzentration berechnet sich für 21 Minuten $k_1 = 0,0370$. Das Verhältnis $k_2/k_1 = 0,0181/0,0370 = 0,5$ ergibt den relativen Alkoholhemmungsfaktor der Reaktionskonstante, berechnet für 21 Minuten. Bei der üblichen Messung von k nach der Halbspaltungszeit (10 Minuten) kann der Alkoholhemmungsfaktor vernachlässigt werden.

Zur Bestimmung der Löslichkeit der Amylase in 50 vol.-%igem Alkohol wurden 0,5 g der Diastase im Porzellanmörser mit 100 ccm 50 %igen Alkohol angerieben und filtriert. Das goldgelbe alkoholische Filtrat wurde für sich untersucht (1 ccm). Der Filtrerrückstand wurde in 100 ccm destillierten Wassers gelöst und davon ebenfalls 1 ccm untersucht. Für die alkoholische Lösung berechnete sich $k_2 = 18$ Minuten = 0,0069. Für die wässrige Lösung des Filtrerrückstandes k_1 18 Minuten = 0,0130. Um die relative Löslichkeit des Enzyms durch Vergleich der Reaktionskonstanten in wässrigem und alkoholischem Medium messen zu können, mußte k_1 mit dem Alkoholhemmungsfaktor 0,5 multipliziert werden. $k_1 \times 0,5 = 0,0065$. Das Verhältnis dieser beiden Konstanten $k_1 \times 0,5/k_2 = 0,0065/0,0069 \sim 1$ gibt ein relatives Maß der Löslichkeit der Amylase in 50 vol.-%igem Alkohol. Hiernach dürften etwa 50 % der Amylase in die 50 vol.-%ige alkoholische Lösung übergegangen sein. Bemerkenswert ist, daß der alkoholische Auszug starke Fehlingreaktion gab, während die wässrige Lösung des Filtrerrückstandes frei von reduzierenden Kohlehydraten war.

Protokolle.

1. Alkoholhemmung (Kurve 1).

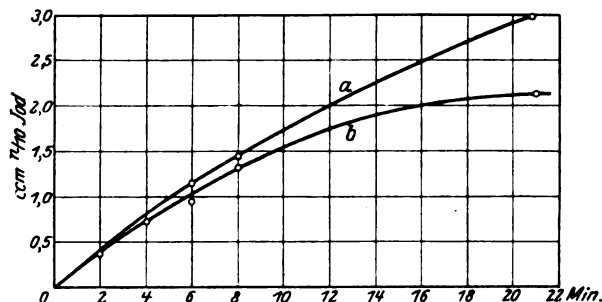


Abb. 1.

0,5 g Diastase wurden zu 100 ccm gelöst und filtriert. Davon wurden zur Bestimmung je 1 ccm Filtrat verwandt.

Ansatz: 1 ccm Filtrat
 1 „ Phosphatmischung
 8 „ 50 vol.-%iger Alkohol
 10 „ 2%ige Stärkelösung
 20 ccm

Zur Titration 10 ccm.

Minuten	n/10 Thiosulfat	n/10 Jod	Minuten	n/10 Thiosulfat	n/10 Jod
0	9,5	0	8	8,2	1,3
2	9,2	0,3	21	7,4	2,1
4	8,8	0,7	∞	2,9	3,6
6	8,6	0,9			

$k_2 = 21 \text{ Minuten} = 0,0181$. (Siehe Kurve 1b.)

Zum Vergleich Ansatz ohne Alkoholzusatz:

1 ccm Filtrat + 9 ccm Phosphatmischung + 10 ccm Stärkelösung.

Zur Titration 10 ccm.

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10,4	0	8	9,0	1,4
2	9,9	0,5	21	7,4	3,0
4	9,7	0,7	∞	6,8	3,6
6	9,3	1,1			

$k_1 = 21 \text{ Minuten} = 0,0370$. (Siehe Kurve 1a.)

2. Amylasealkohollösung (Kurve 2).

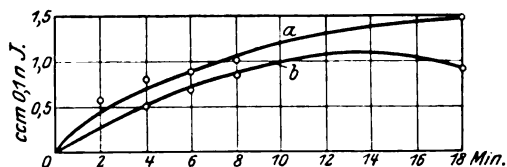


Abb. 2.

0,5 g Diastase wurden mit etwa 100 ccm 50 vol.-%igem Alkohol im Porzellanmörser angerieben und filtriert. Im Maßkölbchen aufgefüllt mit 50 vol.-%igem Alkohol zu 100 ccm. Alkoholische Lösung goldgelb, klar. Zum Ansatz 1 ccm.

Alkoholische Lösung.

Ansatz: 1 ccm Filtrat
 + 9 „ Phosphatmischung
 + 10 „ 2%ige Stärkelösung
 20 ccm

Zur Titration 10 ccm: Kurve 2b, k_2 18 Minuten, $1/18 \cdot \log \cdot \frac{3,6}{2,8} = 0,0069$

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,5	0	8	8,7	0,8
2	9,2	0,3	18	8,6	0,9
4	9,0	0,5	∞	5,9	3,6
6	8,8	0,7			

Filtrerrückstand gelöst zu 100 ccm Wasser.

Zum Ansatz 1 ccm wässrige Lösung des Filtrerrückstandes.

Kurve 2a, k_1 18 Minuten = 0,0130.

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10,3	0	8	9,4	1,0
2	9,7	0,6	18	8,8	1,5
4	9,6	0,8	∞	6,7	3,6
6	9,5	0,9			

Adsorptionsversuche.

Die Adsorptionsmethode, die Willstätter und Mitarbeiter zur Reinigung und Trennung der Enzyme anwenden, beruht auf der Annahme, daß diese Kolloide in Begleitung von hochmolekularen Eiweißstoffen und Kohlehydraten vorkommen, und zwar nicht in einfacher Bindung, sondern durch Adsorptionskräfte miteinander verknüpft. Willstätter kommt zu der Auffassung, daß das Molekül eines Enzyms aus einem kolloiden Träger und einer rein chemisch wirkenden aktiven Gruppe besteht. Je nach der Natur des Ferments bzw. seines kolloiden Trägers empfiehlt sich die Anwendung eines positiven (Aluminiumhydroxyds) oder eines negativen Adsorbens (Kaolin, Zinnsäure).

Versuch mit Kaolin.

Die Amylase wurde in n/10 essigsaurer Lösung durch Kaolin leicht adsorbiert. Kleinere Mengen wurden in starkwandigen Glasröhren an der Maschine mit Kaolin geschüttelt, größere Volumina in

Bechergläsern an der Turbine unter allmählichem Zugeben des Adsorbens stark gerührt. Das Adsorbat wurde nach den Regeln der quantitativen Analyse durch Papierfilter gegossen, mit Wasser gewaschen und dann mit Filter im Becherglas mit der sekundären Phosphatlösung ausgezogen. Bezüglich der Herstellung der optimalen H-Konzentration auf $p_H = 5$ wurde so verfahren, daß zunächst die alkalischen Elutionen mit $n/10$ Essigsäure bis zur Rötung von Lackmus versetzt wurden, dann vorsichtig weitere $n/10$ Essigsäure hinzugegeben wurde, bis zur Neutralität gegen Methylrot. Es wurden Ansätze mit 2%iger Stärkelösung gemacht. Das 1 ccm 0,5%iger Rohdiastase entsprechende Volumen der angesäuerten Elution wirkte auf 10 ccm 2%ige Stärkelösung ein. Nach Zusatz der Puffermischung betrug das Gesamtvolumen 20 ccm, davon wurden 10 ccm mit der alkalischen Jodlösung zur Bestimmung der Maltose verwendet.

Um den Einfluß der amphoteren Eiweißstoffe auszuschalten, wurden Versuche angestellt, die Amylase in alkoholischer Lösung zu adsorbieren. In 50%iger alkoholischer Lösung werden die Eiweißstoffe nach *Willstätter* von Kaolin nicht adsorbiert. Nach etwa 10 Minuten starkem Rühren war das Kaolinadsorbat schwer zum Absetzen zu bringen und schwer filtrierbar. Erst nach Zugabe von primärem Phosphat trat Klärung ein. Es gelang so, durch 20 g Kaolin 1 g Rohdiastase fast vollständig zu adsorbieren. Die Alkoholkonzentration betrug etwa 50 Vol.-%. Die zweite Adsorption an Kaolin in neutraler Lösung verlief quantitativ, dagegen die Elution des aktiven Ferments negativ.

Als Ausgangspräparat diente Diastase *Merck III*, dessen Reaktionskonstante $k_{rel.}$ 10 Minuten = $1/10 \log a/a - x = 0,095424$ betrug. Vor der Kaolinadsorption wurde die Diastase mit Tierkohle behandelt (*Carbo animalis Merck „neu“*). Nach späteren Versuchen beträgt für 1 g Diastase I die Höchstmenge dieser Kohlesorte 10 g. Diastase I enthielt 5,6% Kohlehydrate, während Diastase III 8,5% Kohlehydrate enthält. Proportional zum Gehalt an Kohlehydraten berechnet sich für 1 g Diastase III

$$\frac{10 \cdot 8,5}{5,6} = 15 \text{ g der Merckschen Kohle.}$$

Die Tierkohle wurde mit Wasser geschlemmt und nur die sich rasch zu Boden setzenden Teilchen nach dem Trocknen und Ausglühen verwendet. Die Versuche zeigten, daß die Kohlenmenge tatsächlich ohne Verlust angewandt werden konnte. Der Amylasewert nach der Kohlebehandlung betrug 0,5081, der des Ausgangspräparats 0,3729. Nach der Kohlebehandlung erfolgte die Adsorption an Kaolin. Da durch die Kohlebehandlung die Kohlehydrate abgetrennt werden, mußte der Adsorptionswert von Kaolin neu bestimmt werden. Die Adsorption erfolgte in 50%igem Alkohol, wie es in Vorversuchen ermittelt war. 0,25 g Rohdiastase wurden mit 3,4 g ausgeglühter *Merckscher* Tierkohle behandelt, das Filtrat (125 ccm) mit 50 ccm 96 vol.-%igem Alkohol versetzt und mit 0,5 g Kaolin geschüttelt.

Das Restfiltrat zeigte die Reaktionskonstante k_{rel} 0,00646. Die Differenz der Reaktionskonstanten betrug 0,088 964. Demnach wurde zur vollständigen Adsorption gebraucht

$$\frac{0,5 \cdot 0,095424}{0,088964} = 0,54 \text{ g Kaolin.}$$

Sämtliche Versuche, die aktive Amylase aus den Adsorbaten loszulösen, schlugen fehl. Weder sekundäres Phosphat noch mit MgO gesättigtes Wasser oder zweifach basisches Natriumphosphat bewirkten aktive Elutionen. In den Restfiltraten war keine Amylase mehr nachzuweisen. Auch nach Zugabe der Restflüssigkeit zur Elution erfolgte keine Aktivierung der Amylase. Dagegen entwickelten die Lösungen beim Schütteln einen starken beständigen Schaum. Ferner wurde die interessante Beobachtung gemacht, daß die MgO-Elutionen nach dem Ansäuern mit Essigsäure beim Schütteln mit Benzidin und H_2O_2 sich stark blau färbten. Der blinde Versuch ohne Elutionsflüssigkeit verlief negativ. *Vermutlich wird durch MgO-Wasser die begleitende Peroxydase eluiert.*

Die Adsorptionsversuche lehren, daß bei Anwendung der Mindestmenge Kaolin nach vorangehender Abtrennung der Kohlehydrate durch Tierkohle die Amylase bei der Adsorption inaktiviert wird.

Bei Anwendung der früher ermittelten Menge Kaolin, 20 g auf 1 g Rohdiastase, gelang die Elution durch sekundäres Phosphat. Die Elutionen zeigten positive *Fehling*-Reaktion. Ein großer Teil der Kohlehydrate wird an Kaolin mit absorbiert und schützt die spezifische Gruppe der Amylase vor der Inaktivierung. Zur Bestimmung der Wirksamkeit der Elution mußte der Trockenrückstand der eluierten Amylase bestimmt werden. Von dem Trockenrückstand mußte das zur Elution verwendete Natriumphosphat abgezogen werden. Zu dessen Bestimmung wurde der Glührückstand in destilliertem Wasser gelöst und das Phosphat mit Magnesiummischung gefällt. Die von dem Gesamtrückstand abgezogene Menge Natriumphosphat (2 aq.) ergibt den Trockenrückstand der Amylase.

In der Amylaseemulsion betrug das Verhältnis

$$\text{T.S./}k = 0,009 / 0,019457 = 0,46.$$

Das Ausgangspräparat zeigte das Verhältnis $\text{T.S./}k = 0,04572$. Das eluierte Präparat zeigte demnach den zehnten Teil der Aktivität.

Der größte Teil der Amylase war durch die Kaolinadsorption inaktiviert.

Adsorption an Aluminiumhydroxyd.

Die Darstellung des Aluminiumhydroxyds erfolgte nach Angabe von R. Willstätter und H. Kraut (7). Eine Aluminiumsulfatlösung wurde mit konzentriertem Ammoniak in der Kälte gefällt und durch das Gel 48 Stunden Wasserdampf geleitet. Nach dem Absetzen des Hydroxyds wurde die überstehende Flüssigkeit abgesaugt und das Aluminiumhydroxyd durch Waschen mit heißem Wasser frei von Sulfat gemacht. Das so dargestellte Gel gehört nach den Untersuchungen von R. Willstätter und H. Kraut zu den plastischen Polyaluminiumhydroxyden (8). Zur Feststellung des Gehalts an Al_2O_3 wurden 100 ccm in einer Porzellanschale eingedunstet und stark gegläht. Das Gel enthielt 3,4 % Al_2O_3 .

Die Adsorption an Aluminiumgel wurde in alkoholischer Lösung von etwa 50 Vol.-% ausgeführt. Zur vollkommenen Ausfällung von 0,525 g Rohdiastase II wurden 10 ccm Aluminiumgel benötigt. Zur quantitativen Elution mußte das Aluminiumadsorbat von 10 ccm Gelsuspension mit einer Lösung von 2 g Na_2HPO_4 , 12 H_2O ausgezogen werden. Bei der kolorimetrischen Einstellung der Elutionsflüssigkeit auf die optimale $p_{\text{H}} = 5$ genügten 25 % der theoretischen Menge KH_2PO_4 , 2 H_2O , weil ein großer Teil des sekundären Phosphats von Aluminiumhydroxyd aufgenommen worden war. Zur vollständigen Loslösung des Ferments von 10 ccm Aluminiumgel waren 2 g Na_2HPO_4 , 12 H_2O erforderlichlich.

Die Ausbeute war quantitativ. In der Restflüssigkeit blieben 55 % unwirksame Trockensubstanz. Die Elution zeigte positive Fehling- und Ninhydrinreaktion.

2 g Diastase wurden mit Wasser angerührt, filtriert und zu 200 ccm gelöst. Die Lösung wurde allmählich dunkler durch die Tätigkeit der begleitenden Oxydasen.

Trockensubstanz in 100 ccm = 0,525 g. Zum Ansatz wurden 0,5 ccm verwandt.

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,5	0
20	6,3	3,2

100 ccm Filtrat = 0,525 Diastase und 100 ccm Alkohol (96 %ig) wurden gemischt (Trübung). Unter starkem Turbinieren Zugabe von 5 ccm Aluminiumgel. Nach dem Absitzen Prüfung der überstehenden Flüssigkeit. Zum Ansatz 1 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,7	0
20	9,1	0,6

Trockensubstanz in 100 ccm = 0,493 g.

Das Adsorbat wurde auf kleinem Filter abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Die Waschflüssigkeit (50 ccm) wurde auf Amylase geprüft. Zum Ansatz 1 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,6	0
20	8,4	1,2

Ein beträchtlicher Teil der Amylase war demnach bereits in der Waschflüssigkeit nachweisbar. Wahrscheinlich war bei der hohen Alkoholkonzentration ein Teil gefällt.

Aus dem gewaschenen Adsorbat wurde eluiert mit 0,1 g Na_2HPO_4 , 12 H_2O . Elution 100 ccm. Es trat starke Schaumbildung ein. Nach Absitzenlassen wurde die Elution geprüft. Zum Ansatz 0,5 ccm, entsprechend 0,5 mg Na_2HPO_4 , 12 H_2O .

Die Puffermischung ($p_H = 5$) bestand aus:

0,05 ccm m/15 Na_2HPO_4 , 12 H_2O = 0,5938 mg,

9,95 „ m/15 primäres Phosphat = 90,2761 „

Demnach $90,28/0,594 = x : 0,5$; $x = 76$ mg K_2HPO_4 , 5 H_2O für 0,5 ccm.

Nach Zugabe von 7,6 K_2HPO_4 , 5 H_2O zu 50 ccm Elution, wurden je 10 ccm Elution und 10 ccm Phosphatpuffer ($p_H = 5$) kolorimetrisch verglichen. Der rote Farbton der Elution war bedeutend tiefer. p_H demnach unter 5. Es wurde jetzt zur Feststellung der Menge primären Phosphats ein Reihenversuch angestellt. In fünf kleine Glasröhrchen wurde je 1 ccm Elution pipettiert (ohne Zusatz von primärem Phosphat) und je 1, 2, 3, 4, 5 ccm einer Lösung von primärem Phosphat (1,52 : 100). Zum kolorimetrischen Vergleich diente eine Mischung von 1 ccm Phosphatpuffer in 20 ccm Wasser. Sämtliche Röhrchen wurden auf 10 ccm aufgefüllt und mit einem Tropfen Methylrot (1 : 10) versetzt. Die gleiche Farbtiefe mit der Puffermischung zeigte Röhrchen 2 (2 ccm). Es genügten demnach 2 ccm = 0,0304 g K_2HPO_4 , 5 H_2O .

Demnach zu 50 ccm Elution zwecks Herstellung von $p_H = 5$: 1,520 g K_2HPO_4 , 5 H_2O .

Nach der ersten Elution mit 0,1 g Na_2HPO_4 , 12 H_2O wurde nochmals eluiert mit 0,2 g Na_2HPO_4 15 Minuten lang.

Zur Prüfung 10 ccm + 9 ccm primären Phosphats : 35 ccm. Zum Ansatz 0,5 ccm. Die Einstellung gegenüber Methylrot ergab die nötige Menge von 2,25 KH_2PO_4 .

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,5	0	8	8,6	0,9
4	9,2	0,3	10	8,5	1,0
6	9,0	0,5	20	8,4	1,1

Es wurde demnach nochmals dieselbe Enzymmenge eluiert. Zugabe noch weiterer 0,5 g Na_2HPO_4 , 12 H_2O . Turbinieren $\frac{1}{2}$ Stunde.

10 ccm : 35 ccm angesäuert mit Essigsäure (Methylrot neutral). Während der Nacht Kühlstellen unter Abzug.

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,8	0	8	8,9	0,9
4	9,4	0,4	10	8,8	1,0
6	9,2	0,6	20	7,5	2,3

Vergleich mit Ausgangslösung (0,5:100). Ansatz 1 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,8	0	8	7,2	2,6
4	8,6	1,2	10	7,5	2,3
6	7,8	2,0	20	6,6	3,2

Nochmaliges Eluieren mit 0,3 Na_2HPO_4 , 12 H_2O . Mit n/10 Essigsäure aufgefüllt zu 100 ccm. Zum Ansatz 0,5 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,7	0	8	8,5	1,2
4	9,2	0,5	10	8,3	1,4
6	9,1	0,6	20	7,5	2,2

Keine weitere Elution. Im ganzen verbraucht 1,1 Na_2HPO_4 , 12 H_2O .
Nach Vereinigung sämtlicher Elutionen:

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,3	0
20	6,6	2,7

Zur Loslösung des Ferments von 5 ccm Aluminiumgel (3% Al_2O_3) wurden demnach benötigt 1,1 sekundäres Phosphat.

Versuche mit verschiedenen Eluentien.

Die folgenden Versuche bezweckten, die Amylase aus den Adsorbaten durch andere Eluentien loszulösen, in der Absicht, eine spezifische Elution herbeizuführen.

Es zeigt sich, daß auch das primäre Phosphat imstande ist, geringe Mengen Amylase zu eluieren.

Die Elution mit schwachen Säuren, Kohlensäure, Weinsäure, Borsäure, verlief negativ. Nachfolgende Elution durch basisches Phosphat bewies die Unschädlichkeit von Kohlensäure, während Weinsäure und Borsäure die Amylase inaktivierten.

Die Elutionsfähigkeit von primärem und sekundärem Phosphat verhält sich annähernd wie 1 : 14, beurteilt nach dem Verhältnis der Reaktionskonstanten der verschiedenen Elutionen.

Zum Ansatz 6 ccm: $k_{\text{rel.}} \frac{1}{20} \log \cdot 3,6/1,7 = 0,01629$.

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,6	0
20	7,7	1,9

Elutionsversuch mit primärem Phosphat.

0,5 g Diastase wurden zu 100 ccm gelöst. Zum Ansatz 1 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10	0	8	7,7	2,3
4	7,9	2,1	10	7,1	2,9
6	7,7	2,3	30	6,7	3,3

100 ccm wurden mit 100 ccm 96 vol.-%igem Alkohol versetzt, an der Turbine gerührt und 25 ccm Aluminiumgel hinzugegeben. Nach dem Absitzen des Niederschlags wurde filtriert, der Filtrerrückstand im Becherglas

angerührt mit 5 g primärem Phosphat, gelöst zu 100 cem Wasser. Zum Ansatz 2,7 cem:

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10	0
10	9,4	0,6

Das Aluminiumadsorbat wurde im Becherglas mit sekundärer Natriumphosphatlösung (1 g) ausgezogen und mit n/10 Essigsäure zu 300 cem aufgefüllt. Zum Ansatz 3 cem:

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,7	0
10	8,6	1,1

Adsorption mit kolloidaler Zinnsäure.

Da die Tonsuspension sich nur schwer klären ließ und auch durch Zentrifugieren nicht zum Absitzen zu bringen war, wurde versucht, die Amylase an ein stärker saures Kolloid zu adsorbieren. Hierzu wurde Zinnsäure gewählt.

Darstellung von Zinnsäuregel.

In einer 10-Liter-Flasche mit doppelt durchbohrtem Korkverschluß wurden 80 g Zinnchlorür, 8 aq. in 10 Liter Wasser suspendiert unter achttägigem Durchleiten von Luft. Das Zinnsäuregel setzte sich rasch ab und wurde mehrere Tage mit siedendem Wasser gewaschen, bis die Reaktion auf Chlorionen negativ war. Der sich zuerst absetzende gelbe Niederschlag rührte von der Adsorption von SnCl_2 an Zinnsäure her und wurde verworfen. Zur Bestimmung des Gehalts an SnO_2 wurden 50 cem in einer Porzellanschale eingedunstet, bis zu Konstanz gegläht und gewogen.

Die Zinnsäuresuspension enthielt etwa 1 % SnO_2 .

Die Adsorptionsversuche zeigen, daß bereits 10 cem dieser Zinnsäuresuspension = 0,1 g SnO_2 genügen, um eine 1 %ige Diastaselösung fast vollständig enzymfrei zu machen. Die Elution gelang mit sekundärem Natriumphosphat. Das 1 cem 0,5 %iger Rohdiastase entsprechende Volumen der mit Essigsäure angesäuerten Elution wirkte auf 10 cem 2 %ige Stärkelösung wie üblich ein. Die Elutionen wurden kühl aufbewahrt, zeigten aber bereits nach 24 Stunden vollkommene Wirkungslosigkeit, obwohl die Lösung wasserklar und schäumend geblieben war. Beim Eindunsten der frischen, klaren Elution und Glühen verblieb ein gelber Rückstand, der bei Erkalten wieder weiß wurde: SnO_2 . Die Elution enthielt demnach kolloidal gelöste Zinnsäureteilchen.

Die Bestimmung der Trockensubstanz in der Restflüssigkeit ergab, daß etwa 71 % unwirksamer Rückstand abgetrennt war. Die frischen, noch wirksamen Elutionen zeigten mit Ninhydrinlösung erhitzt keine Blaufärbung. Die Zinnsäure hatte demnach den begleitenden Eiweißstoff abgetrennt.

Protokolle der Hauptversuche.

1 g Diastase wurde gelöst zu 50 ccm. Hinzugegeben 50 ccm 96 vol.-%iger Alkohol.

An der Turbine gerührt (etwa 1 Minute) und hinzugegeben: 10 ccm Zinnsäuregelsuspension.

Die Flüssigkeit wurde nach Absetzen der Zinnsäure durch Faltenfilter filtriert und der Filtrerrückstand mit Wasser nachgewaschen.

Restfiltrat betrug mit Waschflüssigkeit 230 ccm. Davon wurden zum Ansatz verwandt: 1,2 ccm (entsprechend 5 mg Ausgangspräparat).

Ansatz 1,2 ccm Filtrat + 8,8 ccm Phosphatmischung + 10 ccm 2%ige Stärkelösung (Gesamtvolumen 20 ccm, 10 ccm zur Titration):

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	8,9	0
30	8,7	0,2

Elution.

Der Filtrerrückstand wurde mit Filter quantitativ in ein Becherglas überführt und ausgezogen mit einer Lösung von 5 g sekundärem Phosphat. Die schäumende Elutionsflüssigkeit betrug 300 ccm. Zur Neutralisation gegen Methylrot wurde angesäuert mit 250 ccm n/10 Essigsäure. Das Gesamtvolumen betrug 550 ccm. Entsprechend 5 mg Ausgangspräparat wurden zum Ansatz 2,5 ccm verwandt.

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,7	0
20	7,3	2,4

Zum Vergleich wurden 1 ccm 0,5%ige unbehandelte Diastaselösung auf Rohpräparat berechnet) in gleicher Weise angesetzt. Ansatz:

1 ccm 0,5%ige Diastaselösung
 9 „ Phosphatmischung.
 10 „ 2%ige Stärkelösung
 20 ccm

Zur Titration wie üblich 10 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,8	0
20	6,5	3,3

Bemerkung: Obige Elution nach 10 Minuten unwirksam.

Reinigung unter Maltoseschutz.

Nach *Wohl* und *Glimm* (9) ist die Vorbedingung für die Stärkehydrolyse die Anlagerung der Amylase an das Substrat. Mit dieser Anlagerung dürfte eine Trennung des eigentlichen Amylasekomplexes von seinen Begleitstoffen verbunden sein. Ferner haben *Lüers* und *Lorinser* (10) auf Grund quantitativer Versuche in Übereinstimmung mit *Wohl* und *Glimm* (11) nachgewiesen, daß die Maltose starke Schutzwirkung beim Erhitzen der Maltoselösungen ausübt. Es erschien daher möglich, durch Erhitzen von verzuckerten Stärkelösungen die höher molekularen Begleitstoffe der Amylase zu zerstören und auszufällen, ohne die Amylase zu schädigen. Es wurde versucht, die Amylase aus der Lösung an Aluminiumhydroxyd oder Kaolin zu adsorbieren. Ferner wurde die Entfernung der Maltose durch Dialyse versucht.

10 ccm Stärkelösung enthielten $0,15 \cdot 0,8474 = 0,1271$ g Stärke, $10/9 \cdot 0,1271 = 0,14122$ g Maltose (wasserfrei), $0,14122 \cdot 18/17,5 = 0,1493$ Maltose (H_2O).

Es zeigt sich, daß die Amylase nach erstmaliger Verzuckerung des Stärkesubstrats bei $40^{\circ}C$ sowohl von Aluminiumhydroxyd und auch von Kaolin adsorbierbar ist.

Nach längerem Erhitzen der Amylase in Gegenwart der gebildeten Maltose fielen gelbe Flocken aus, die, mit Ninhydrinlösung erhitzt, sich blau färbten. Das Restfiltrat zeigte unter Berücksichtigung der Maltosehemmung keine Schädigung der Amylase.

Die Amylase war in diesem Zustande aus dem Restfiltrat adsorbierbar; dagegen *verlief die Elution negativ*.

Es wurde versucht, die Trennung der Amylase von der Maltose durch *Dialyse* zu erreichen. Als Dialysiermembran diente entfettete, getrocknete Schweinsblase, die sich als undurchlässig für Lösungen käuflicher Diastasepräparate, also ungereinigter Diastase, zeigte. Durch Abdiffundieren von Milchzucker, mit dem das Handelspräparat vermischt war, stieg die Verzuckerungsgeschwindigkeit, was sich in dem Anwachsen der Jodtitrationswerte zeigte (das käufliche Präparat, Maltin *Merck*, enthielt Beimischungen von Milchzucker).

Nach der Verzuckerung von Stärkelösung und Erhitzen der Amylase-Lösung in Gegenwart der gebildeten Maltose trat dagegen keine Erhöhung der Jodtitrationswerte ein, was auf gleichzeitiger Diffusion von Maltose bzw. Milchzucker und Amylase beruhen dürfte.

Um die Wirkung der Amylase in Gegenwart wechselnder Mengen Maltose verfolgen zu können, wurden die Hemmungskurven für Maltose bestimmt. Die Maltoselösung enthielt 18 g Maltose *Merck*, kristallisiert,

in 1000 ccm Wasser. Dies entspricht bei einem Molekulargewicht 360 für Maltose einer m/20 Maltoselösung.

Zunächst wurde die Kurve ohne Maltosezusatz ermittelt für folgende Ansätze:

1 ccm Diastaselösung (0,5 : 100)
 10 „ 2%ige Stärkelösung
 9 „ Phosphatlösung
 20 ccm Gesamtvolumen.

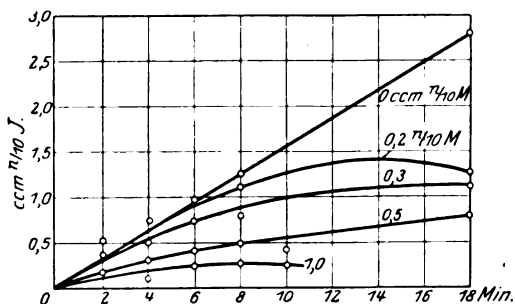


Abb. 3.

Auf der Abszisse der vorstehenden Abbildung ist die Zeit t in Minuten, auf der Ordinate die gebildete Maltose in Kubikzentimetern der verbrauchten n/10 Jodlösung angegeben.

Nach Zugabe von 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1 und 2 ccm m/20 Maltoselösung in Gesamtvolumen 20 ccm für die Bestimmungskurve wurden die Punkte für die verschiedenen Kurven ermittelt und graphisch dargestellt.

1. 0,5%ige Diastase 1 ccm
 m/20 Maltose 4 „
 Phosphatmischung 5 „
 2%ige Stärke 10 „

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	8,3	0
20	8,3	0

2. m/20 Maltose 1 ccm

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,3	0	8	9,0	0,3
4	9,2	0,1	10	8,9	0,4
6	9,1	0,2	18	9,0	0,3

3. m/20 Maltose 2 ccm

Minuten	Thiosulfat	Jod
6	9,3	0
10	9,0	0,3

4. m/20 Maltose 0.5 ccm

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10.2	0	6	9.8	0.4
2	10.0	0.2	8	9.7	0.5
4	9.9	0.3	18	9.4	0.8

5. m/20 Maltose 0.4 ccm

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10.2	0	6	9.5	0.7
2	9.8	0.4	8	9.4	0.8
4	9.7	0.5	18	9.4	0.8

6. m/20 Maltose 0.3 ccm

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10.1	0	6	9.4	0.7
2	9.7	0.4	8	9.3	0.8
4	9.6	0.5	18	9.0	1.1

7. m/20 Maltose 0.2 ccm

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9.8	0	6	8.9	0.9
2	9.4	0.4	8	8.7	1.1
4	9.2	0.6	18	8.5	1.3

Diastase (0.5 : 100) 1 ccm

Ohne Maltosezusatz.

Minuten	Thiosulfat	Jod	Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9.9	0	6	8.9	1.0
2	9.3	0.6	8	8.5	1.4
4	9.2	0.7	18	7.2	2.7

Adsorption der Amylase aus der verzuckerten Lösung.

5 g Diastase, mit Wasser angerieben und filtriert, 50 g lösliche Stärke, mit Wasser angerieben, 200 ccm Phosphatmischung. Gesamtvolumen 1000 ccm wurden in einem Becherglas bei 40° der Verzuckerung überlassen. Vom Filtrat wurden angesetzt 1 ccm (5 mg Rohamyase):

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	8.3	0
20	6.2	2.1

Adsorption aus der verzuckerten Lösung 1000 ccm, 96%iger Alkohol = 1000 ccm wurden an der Turbine gerührt und hinzugegeben Aluminiumgel 1000 ccm = 6,0 g Al_2O_3 . Filtrat wasserklar, Adsorption quantitativ.

Elution.

Der Niederschlag wurde abfiltriert und in einem Becherglas mit einer Lösung von 8 g Na_2HPO_4 , 12 H_2O 10 Minuten turbinert. 700 ccm Elution wurden angesäuert mit 300 ccm n/10 Essigsäure. Davon wurde zum Ansatz verwendet 1 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,5	0
20	7,2	2,3

Adsorption an Zinkphosphat und Elution.

Die bisherigen Versuche waren vorzüglich der Methode *Willstätters* gefolgt, die bei der Pankreasamylase zu so großen Erfolgen geführt hatte. Leider waren die Ergebnisse bei der Übertragung auf die Malz-amylase nur von geringem Erfolg begleitet. Wenn auch in einigen Fällen die Bindung der Amylase an ein Adsorptionsmittel quantitativ erfolgte, so stellten sich der Elution ungeahnte Schwierigkeiten entgegen. Außer Aluminiumhydroxyd hielten die Kolloidadsorbentien das Enzym so fest, daß eine Trennung nur unter großen Verlusten an aktiver Substanz ermöglicht werden konnte.

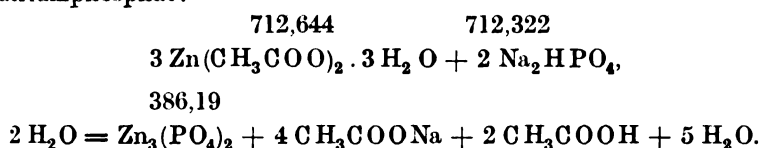
Wir dachten nun daran, zur Enzymreinigung Stoffe zu verwenden, die in meßbarer Zeit aus dem kolloiden Zustand in den kristallinen übergehen. Die Reinigung könnte dann so vor sich gehen, daß die Adsorbentien in der ersten kolloiden Stufe das Enzym mit den Begleitstoffen an sich reißen und dann bei der darauf eintretenden Umwandlung in Kristalloide das eingefangene Enzym in reinerem Zustande wieder freigeben.

Durch Vorversuche war festgestellt, daß die Adsorption der Amylase an Zinkcarbonat und die Elution durch Überführung des Zinkcarbonats in Zinkammoniumphosphat gelingt. Jedoch war ein höherer Wirkungsgrad der Amylase nicht erzielt worden.

Von anderen Zinksalzen, die im Entstehungsmoment kolloidal ausfallen, ragt vor allem das Zinkphosphat hervor. Durch Zusatz von Alkohol in einer Konzentration von etwa 20 Vol.-% gelang es, das Zinkphosphat während der Zeit des Abnutschens kolloidal zu erhalten. Ohne Zusatz von Alkohol war eine Adsorption nicht zu erreichen, da das Phosphat dann zu rasch wieder in den kristallinen Zustand überging. Die Elution gelang mit viel Wasser unter starkem Rühren an der Turbine. In vielen Fällen mußte eine halbe Stunde gerührt werden. Die Entwicklung eines beständigen weißen Schaumes zeigte die Loslösung der Amylase an. Gleichzeitig fiel der gelatinöse Zinkphosphatniederschlag zusammen.

Darstellung von gallertigem Zinkphosphat.

Die Umsetzung erfolgte zwischen Zinkacetat und sekundärem Natriumphosphat:



Zur Adsorption von 1 g Rohdiastase mußten 10 g Zinkacetat angesetzt werden. Die Zinkacetatlösung mußte mit verdünnter Essigsäure tropfenweise angesäuert werden, da das Zinkacetat eine Spur Carbonat enthielt. Wenn für Zinkphosphat 386,19 angesetzt wird, so sind zur Adsorption von 1 g Rohdiastase $386,19 \cdot 10/712,644 = 5,41$ g Zinkphosphat nötig. Während die Adsorbate der Amylase an Aluminiumhydroxyd, Kaolin und Zinnsäure Stärke abbauten, ist dies bei den Zinkphosphatadsorbaten nicht der Fall. Kleine Proben Stärkelösung mit Zinkphosphatadsorbaten geschüttelt, gaben nach längerem Verweilen im Wasserbad bei 40° C mit Jod tiefblaue Färbung. Um die Adsorption der Stärke zu vermeiden, mußten die Probierröhrchen aufgeschüttelt werden.

Das Zinkacetat wurde in der Diastaselösung gelöst und die Lösung durch Eis gekühlt. Inzwischen wurde in einem Becherglas die Natriumphosphatlösung bereitet und ebenfalls gekühlt. Dann wurde die Phosphatlösung zu der Amylasezinkacetatlösung gegossen und sofort die nötige Menge Alkohol hinzugegeben. Es entstand ein gallertartiger, weißer Brei, der sofort auf einer großen Nutsche durch eine gut ziehende Wasserstrahlpumpe scharf abgesaugt wurde, bis der Geruch nach Alkohol verschwunden war. Der auf der Nutsche gebliebene weiße Niederschlag wurde dann in ein Becherglas überführt und mit etwa 500 ccm Wasser $\frac{1}{2}$ Stunde lang stark an der Turbine gerührt. Der voluminöse Niederschlag sinterte zusammen und die Schaumentwicklung zeigte die Elution der Amylase an. Größere Mengen Diastase zu verarbeiten gelang nicht, da das Absaugen des Zinkphosphats infolge Anhäufung der Flüssigkeitsmengen zu viel Zeit in Anspruch nahm, so daß das Zinkphosphat bereits während des Absaugens kristallin wurde. Bei einer Erhöhung der Alkoholmenge auf 50 Vol.-% blieb das Zinkphosphat kolloidal und war auch durch tagelanges Führen mit Wasser nicht mehr in den kristallinen Zustand zu überführen. Die Elutionen reagierten gegen Lackmus schwach alkalisch. Zn war durch Schwefelammonlösung nicht nachweisbar, dagegen PO_4 durch Fällung mit Magnesiamischung. Der eingedampfte Trockenrückstand zeigte, mit verdünnter Schwefelsäure auf dem Wasserbad erwärmt starken Geruch nach Essigsäure. Die Elutionen enthielten demnach sowohl Phosphat

wie Natriumacetat. Infolgedessen war eine exakte Trockenbestimmung nicht möglich. Durch 48stündige Dialyse von 10 ccm Elution durch eine Filterkerze gegen 3×10 Liter destillierten Wassers gelang es schließlich, die Salze zu entfernen. Zur Prüfung auf Essigsäure diente die Eisenchloridreaktion. Zur Bestimmung der Verzuckerungsfähigkeit wurde der Trockenrückstand unter Zugrundelegung derselben Trockensubstanz in je 0,5 ccm mit ungereinigter Diastase bezüglich der in 10 Minuten verbrauchten Kubikzentimeter n/10 Jodlösung verglichen. Das mit Zinkphosphat behandelte Präparat zeigte die halbe Wirksamkeit.

Adsorption an Zinkphosphat und Elution.

1 g Amylase wurde zu 100 ccm gelöst. Darin aufgelöst 10 g Zinkacetat. Hinzugegeben: Natriumphosphat, zum Schluß Zugabe von 250 ccm Alkohol. Sofort nach Zusammengießen Filtration durch Faltenfilter. Die Restlösung betrug 500 ccm. Zum Ansatz verwandt 2,5 ccm.

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,8	0	blau
20	9,1	0,7	

Elution durch starkes Rühren des gallertigen Niederschlags mit Wasser an der Turbine im Becherglas. Dauer des Turbinierens etwa 30 Minuten, bis der Niederschlag kristallin wurde. Schaumbildung. Reaktion: Lackmus neutral, Methylrot alkalisch. Zugabe von 0,5 ccm primären Phosphats zu 20 ccm Elution. Davon zum Ansatz 2,5 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,6	0	violett
20	7,8	1,8	

Zum Vergleich Ansatz mit unbehandelter Diastase: 1 g Diastase wurden zu 100 ccm gelöst. Davon zum Ansatz 0,5 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,7	0	rotbraun
20	6,9	2,8	

10 ccm Elution wurden dialysiert durch Filterkerzen. Rückstand eindunsten auf Uhrglas im Vakuum 50 Stunden.

Zum Vergleich Bestimmung der Trockensubstanz der Ausgangsamyylase. Amylase T.S. 0.3210 in 50 ccm, in 0,5 ccm 3,21 mg. Ansatz 0,5 ccm.

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	7.8	0
20	4.8	3

Gereinigte Amylase.

Um die gleiche Konzentration (1:100) 0,5 ccm zum Ansatz zu verwenden, mußte 0,0888 der gereinigten Diastase aufgelöst werden zu:

$$8,8 \cdot 0,5/3,21 = 1,4 \text{ ccm,}$$

davon zum Ansatz 0,5 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,9	0	
20	8,5	1,4	braun

Behandlung mit ausgeglühter Tierkohle.

Vorversuche.

Die folgenden Versuche behandeln die Reinigung der Diastaselösungen mit Tierkohle. Als Kohlepräparat wurde Tierkohle *Merck I* verwendet. Es wurden auf 1 g Rohdiastase ($k_{\text{rel.}} = 0,05$) bis zu 10 g Tierkohle ohne Verlust an Enzym vertragen. Zum Schutze der Amylase gegen die Adsorption wurde Maltose verwandt, die durch Verzuckerung von Stärke gebildet wurde. Die Konzentration der Stärke wurde zunächst so gewählt, daß auf 1 g Rohdiastase 8 g Stärke fielen. Die Trennung von der Maltose sollte durch Dialyse erreicht werden. Als Dialysator diente jetzt ein Glaszylinder von etwa 1000 ccm Inhalt, dessen eine Öffnung mit Pergament überspannt war. Die Verbindungsstellen waren sorgfältig mit Kollodium abgedichtet. Vor der Dialyse wurde auf Durchlässigkeit von löslicher Stärke geprüft, indem das zur Dialyse dienende Wasser nach etwa 4 Stunden mit einem Tropfen Jodlösung geprüft wurde. Gegen lösliche Stärke war die Membran undurchlässig. Nach 72 Stunden Dialyse gegen 3×10 Liter destillierten Wassers wurde der Trockenrückstand der dialysierten Enzymlösung bestimmt. 0,144 g Trockenrückstand wurden gelöst zu 17 ccm destilliertem Wasser und 0,5 ccm zum Ansatz auf Stärke verwandt, entsprechend der üblichen Menge 5 mg Ausgangspräparat (auf Rohdiastase berechnet). Die dialysierte Lösung, die noch stark schäumte, zeigte keine Verzuckerungsfähigkeit. Die Bestimmung der Maltose nach der Hypojoditmethode ergab in 0,5 ccm 2,2 n/10 Jod. Dies entspricht nach der Maltosehemmungskurve der vollkommenen Hemmung der Amylase. Es ist anzunehmen, daß die Amylase mit der Maltose gleichzeitig hindurchdiffundiert ist. Ein zweiter Versuch, in dem die Dialyse durch eine Tonfilterkerze vor sich ging, versagte, da die Enzymlösung trübe und flockig wurde. Es wurden weitere Versuche angestellt, um zu ermitteln, ob die in der Diastaselösung bereits vorhandenen Dextrine einen genügenden Schutz der Amylase gegen die Kohleadsorption bieten.

Es zeigte sich, daß auch ohne Maltosezusatz bis zu 10 g Tierkohle auf 1 g Rohdiastase vertragen wurden.

Das Filtrat, das durch Kohleteilchen eine dunkle Färbung angenommen hat, zeigte, mit *Fehlingscher* Lösung erhitzt, keine Ausscheidung von Cu_2O . Die Dextrine waren durch Adsorption an Tierkohle entfernt. Dagegen war die Reaktion nach *Molisch* noch positiv.

Reinigung der Amylase mit Tierkohle unter Maltoseschutz.

Protokolle.

8 g Stärke wurden mit 50 ccm Wasser angerieben, hinzugegeben eine Anreibung von Diastase 1,0 g. Verzuckerungstemperatur 40°C . Die Ansatzlösung verblieb 3 Stunden in dieser Temperatur. Darauf wurde durch Faltenfilter filtriert. Die Lösung versetzt mit 10 g Tierkohle.

Das Filtrat wurde noch warm dialysiert. Als Dialysator diente Pergament, das mit einer dünnen Schicht Kollodium überzogen war. Dialyse gegen etwa 10 Liter destillierten Wassers. Dauer der Dialyse 72 Stunden.

Nach 72 Stunden Bestimmung der Trockensubstanz im Dialysator:

Amylase-Trockensubstanz 0,144 g.

Bezogen auf 3 mg Trockenrückstand des Ausgangspräparats wurden gelöst 0,144 g Trockensubstanz zu 17 ccm Wasser. Davon wurden zur Bestimmung 0,5 ccm verwandt. Die Lösung des Rückstandes schäumte stark.

2%ige Stärkelösung	10 ccm
Amylase-Lösung	0,5 „
Puffermischung	9,5 „
	20 ccm

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	7,6	0	
20	7,6	0	blau

Zur Bestimmung der Maltose wurde in 1 ccm nach der Hypojoditmethode die Menge $n/10$ Jod ermittelt.

1 ccm verbrauchte	4,4 $n/10$ Jod
0,5 „ „	2,2 $n/10$ „

Dies entspricht der absoluten Maltosehemmung nach der Hemmungskurve.

Infolge der starken Schäumung der Fermentlösungen ist es nicht möglich, das Eindampfen im gewöhnlichen Claisenkolben oder in einer Saugflasche vorzunehmen. Versuche zeigten, daß fast die ganze Flüssigkeit durch die Schaumentwicklung fortgesaugt wurde.

Bei kleineren Mengen (bis 100 ccm) war es möglich, das Einengen in dem zur Verfügung stehenden Vakuumtrockenschrank mit Glycerinmantel in etwa 72 Stunden bei 40°C Außentemperatur vorzunehmen.

Zu diesem Zwecke wurden die Lösungen in mehreren gewogenen Porzellanschälchen auf der oberen Horde des Vakuumtrockenschanks eingedunstet. Das Vakuum ist in diesen Apparaten so niedrig, daß ein Schäumen nicht eintritt. Zum Einengen größerer Flüssigkeitsvolumina

benutzten wir Rundkolben, die rechtwinklig zu dem Kolbenhals noch einen Ansatz trugen, an dem die Wasserstrahlpumpe unter Vorlage eines Manometers mit Waschflasche angeschlossen war. Durch den Kolbenhals führte die Kapillare.

Die Außentemperatur wurde durch ein Wasserbad mit untergesetztem Mikrobrenner auf 30° C konstant gehalten. Das Vakuum betrug etwa 25 mm.

Als Ausgangspräparat diente Diastase *Merck* vom Amylasewert Am.W. = 0,2.

3,0 g Diastase I wurden quantitativ gelöst zu 300 ccm, zum Ver-zuckerungsansatz wurden 0,5 ccm verwandt:

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10	0
10	8,1	1,9

Am.W. = $k \cdot 0,01/0,0031 = 0,2$.

Ermittlung der Höchstmenge der Tierkohle I.

Diastase I wurde zu 100 ccm gelöst. 25 ccm = 0,25 g Diastase wurden geschüttelt mit 2,5 g Tierkohle. Es wurde durch Faltenfilter filtriert. Filtrat + Waschwasser betrug 110 ccm. Zum Ansatz wurden 2,2 ccm verwandt.

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10,3	0
10	8,8	1,5

Weitere Kohlebehandlung mit 2,5 g Tierkohle.

Das Filtrat vorheriger Kohlebehandlung wurde mit weiteren 2,5 g Tierkohle geschüttelt und durch Faltenfilter filtriert. Filtrat durch Wasch-wasser betrug 100 ccm. Davon wurden zum Ansatz verwandt 2 ccm.

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10,4	0
10	10,4	0

25 ccm Diastaselösung = 0,25 g Diastase wurden jetzt geschüttelt mit 4 g Tierkohle. Das Filtrat wurde auf 25 ccm aufgefüllt und zur Be-stimmung 0,5 ccm verwandt.

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10,3	0
10	9,4	0,9

Bemerkung: Es wurden stets dieselben Konzentrationsverhältnisse zum Vergleich der Enzymlösungen angewandt. Das 1 ccm 0,5%iger Roh-diastaselösung entsprechende Volumen der mit Kohle gereinigten Diastase-lösung diente zum Vergleich.

100 ccm Diastaselösung (1 g Rohdiastase), 5 g Tierkohle I mit Wasser geschlemmt, im Becherglas 10 Minuten turbiniert.

Filtrat durch Faltenfilter gegossen, durch Kohleteilchen dunkel gefärbt, schäumend. 50 ccm wurden in einer Schale im Vakuumtrockenschrank eingedunstet. Dauer 50 Stunden. Temperatur 40° Außenheizung.

Es verblieb in der Schale auf dem Boden eine braune, amorphe Masse.

An den Seiten der Schale hatten sich weiße, durchscheinende, hornartige Blättchen abgeschieden.

Die braune, amorphe Masse reduzierte *Fehlingsche* Lösung, erwies sich somit als dextrinartig, färbte sich mit Jod gelb und löste sich in verdünntem Weingeist, erwies sich demnach als Maltodextrin.

Eine Probe der Blättchen wurde mit etwas Stärkelösung und Phosphatpuffer bei 40° C unter Verschuß erwärmt. *Die Jodprobe zeigte vollkommenen Abbau der Stärke.*

Wiederholung der Versuche, aber mit der Höchstmenge von 10 g Tierkohle.

Es wurde 1 g Diastase in 100 ccm allmählich versetzt mit einer Anschwemmung von 10 g Kohle unter etwa 1 Minute langem Turbinieren. 50 ccm des Filtrats wurden in einer gewogenen Schale im Vakuumtrockenschrank eingedunstet. Gegen Ende wurde der Inhalt der Schale von den ausgeflockten Kohleteilchen durch Filtration befreit und dann bis zur Trockne eingedunstet (55 Stunden). Jetzt waren die braunen Dextrine auf dem Boden der Schale vollkommen verschwunden infolge Adsorption an die Tierkohle. An den Seiten der Schale fanden sich wieder die obigen weißen Blättchen. Zur Bestimmung der Trockensubstanz wurde die Schale im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure 6 Stunden aufbewahrt. Das Leergewicht der Schale war vorher bestimmt worden.

Die Trockensubstanz betrug 0,090 g.

Diese Amylasemenge wurde zwecks Feststellung der Verzuckerungsfähigkeit aufgelöst zu 30 ccm. Hiervon wurde zum Ansatz 1 ccm verwendet. Dies entspricht der Konzentration des Ausgangspräparats (0,642 : 100) : 0,5 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	10,3	0	
10	9,7	0,6	
30	9,7	0,6	violett

Wiederholung: 10 g Diastase + 250,0 H₂O angerührt und filtriert. 100 g Tierkohle in Schale angeschlemmt. Filtrat durch Faltenfilter mit etwa 5 g Kieselgur geklärt. Eindampfen in der größeren Literglocke. 25 mm 30° C. Auf dem Boden der Glocke blieb ein weißer Belag zurück. Ein Teil wurde vorsichtig herausgekratzt und im Wäagegläschen nach 12stündigem Stehen im Exsikkator das Gewicht bestimmt.

Die so gefundene Trockensubstanz betrug 0,2708 g.

Obige Blättchen wurden in der Schale mit 84 g Wasser gelöst. Zur Bestimmung wurde zum Ansatz 1 ccm verwandt.

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10,3	0
10	7,4	2,8

Vergleich mit unbehandelter Diastase (0,642 g T.S. : 100) 1 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	10	0
10	8,1	1,9

Berechnung des Amylasowertes:

$$k = 1/10 \cdot 2,3026 \cdot \log 3,6/0,7 = 0,163\,576.$$

$$\text{A.W.} = \frac{k \cdot 0,01}{\text{g Präparat}}.$$

Berechnung von Gramm Präparat:

In 84 ccm 0,2708 g Amylase,

$$\text{In 1 ccm } \frac{0,2708}{84} = 0,0032 \text{ g Amylase.}$$

Demnach:

$$\text{A.W.} = \frac{0,163\,576 \cdot 0,01}{0,0032},$$

$$\text{A.W.} = 0,5118, \text{ Vz.F. (Euler)} = 6,5.$$

Der Wirkungsgrad der Amylase nach der Kohlebehandlung war auf das $2\frac{1}{2}$ fache gestiegen.

Reaktion der gereinigten Lösung: Ninhydrinreaktion positiv, Molischreaktion positiv, mit Ferrocyankalium + Essigsäure keine Fällung, mit Pikrinsäurelösung (1%ig) keine Fällung.

Die Adsorption durch mit Ammoncarbonat geglühte Tierkohle erfolgte in der angegebenen Weise. Die Resultate stellten sich noch etwas günstiger:

$$\text{A.W.} = 0,627$$

$$\text{Vz.F.} = 7,8$$

Diastase 1,0 g wurde zu 200 ccm gelöst. Im Becherglas turbiniert und versetzt wurden 50 ccm = 0,25 ccm Diastase mit 3,4 g Tierkohle (aktiv). Filtrat betrug 125 ccm. Zum Ansatz wurden 2,5 ccm verwandt:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,6	0	
10	6,6	3,0	braun

$$k = 0,230\,26 \cdot \log 3,6/0,6 = 0,2195.$$

Die Bestimmung der Trockensubstanz ergab:

$$\text{in 10 ccm} \dots 0,014 \text{ g}$$

$$,, \quad 2,5 \text{ „} \dots 0,0035 \text{ g}$$

demnach:

$$\text{A.W.} = 0,2195 \cdot 0,01/0,0035 = 0,6271.$$

Adsorption an Tierkohle nach aseptischer Autolyse.

In den vorangehenden Versuchen gelang es, die Diastasepräparate auf den zwei- bis dreifachen Wirkungswert zu bringen. Die begleitenden Dextrine waren durch die Kohleadsorption vollkommen beseitigt. Nach dem Einengen im Vakuum hinterblieben weiße Blättchen, die sich klar im Wasser zu einer schäumenden Flüssigkeit lösten. Die Lösungen gaben aber noch starke Reaktion nach *Molisch* und starke Ninhydrinreaktion. Um die gleichzeitige Adsorption weiterer mit der Amylase durch Adsorptionskräfte vergesellschafteter Eiweißstoffe und Kohlehydrate durch die Tierkohle zu erreichen, mußten diese Ballaststoffe von der Amylase losgelöst werden, um die Mitadsorption der Amylase selbst zu verhindern. Diese geschah durch *aseptische Autolyse gealterter Diastaselösungen*.

Nach unseren Versuchen behalten Diastaselösungen nach längerem Altern im verschlossenen Gefäß über eine Woche lang die volle Aktivität. Das Altern erfolgte in einer verschlossenen Glasstöpselflasche bei einer Zimmertemperatur von etwa 15 bis 20° C.

1 g Diastase wurde in einer Schale mit etwas Wasser angerührt, durch Faltenfilter filtriert und zu 100 ccm quantitativ gelöst. Zum Ansatz wurden in üblicher Weise 0,5 ccm verwandt:

Minuten	Thiosulfat	Jod	$a - x$	k
0	10,4	0	4	
2	9,9	0,5	3,5	0,0209
4	9,7	0,7	3,3	0,0233
6	9,3	1,1	2,9	0,0234
8	9,0	1,4	2,6	0,0234
21	7,4	3,0	1,0	0,0290
				0,025

Die Lösung blieb 2 Tage stehen, war trübe und sauer gegen Lackmus. Zum Ansatz wurden wieder 0,5 ccm verwandt:

Minuten	Thiosulfat	Jod	$a - x$	k
0	10,2	0	4	
3	9,9	0,3	3,7	0,0113
4	9,6	0,6	3,4	0,0176
6	9,4	0,8	3,2	0,0161
8	9,3	0,9	3,1	0,0138
18	8,0	2,2	1,8	0,0190
				0,0155

Nach 4 Tagen:

Minuten	Thiosulfat	Jod	$a - x$	k
0	10,2	0	4,0	
2	9,9	0,3	3,7	0,0169
4	9,6	0,6	3,4	0,0176
6	9,0	1,2	2,8	0,0258
12	8,8	1,4	2,6	0,0156
18	8,4	1,8	2,2	0,0144
				0,02

Nach 10 Tagen trübe, flockig, übel riechend.

Minuten	Thiosulfat	Jod	$a - x$	k
0	10,5	0	0	
2	10,0	0,5	3,5	0,0290
4	9,8	0,7	3,4	0,0209
6	9,3	1,2	2,8	0,0258
8	9,0	1,4	2,6	0,0234
21	7,4	3,0	1,0	0,0290
				0,025

Diastaselösungen in unbedeckten Gefäßen verlieren ihre Aktivität sehr schnell infolge der zersetzenden Tätigkeit hereingefallener Bakterien.

Die in einer Glasstöpselflasche aufbewahrte Lösung war nach 10 Tagen trübe und übelriechend (milchige Flüssigkeit). Die Bestimmung der Reaktionskonstanten ergab jedoch dieselbe Aktivität wie die des Ausgangspräparats.

Die Amylase scheint sich demnach infolge Autolyse von den assoziierten hochmolekularen Begleitstoffen langsam loszulösen. Um Bakterientätigkeit auszuschalten, wurde die Diastaselösung in den weiteren Versuchen mit Toluol etwa 20 Minuten lang an der Turbine gerührt. Die Toluoldecke schützte vor weiterer Infektion.

Um die hydrolytische Tätigkeit zu verstärken, wurde mit stark verdünnten Diastaselösungen gearbeitet (1 : 800). Das Altern erfolgte in einer 10 Liter-Weithalsflasche, zunächst 2 Tage lang über der Heizung bei 40° C. In der trübe gewordenen Flüssigkeit hatte sich ein feiner kolloider Niederschlag gebildet. Die Adsorption der durch die Autolyse abgetrennten Begleitstoffe erfolgte an Tierkohle.

Da die in den vorangehenden Versuchen verwendete Tierkohle teilweise mit durch das Filter lief, wurde mit anderen Kohlsorten von größerer Dispersität und höherem spezifischen Gewicht gearbeitet. Es mußte zunächst durch Vorversuche experimentell die Höchstmenge der betreffenden Kohlsorte bestimmt werden, die gerade aus-

reichte, um die durch Autolyse losgelösten Ballaststoffe zusammen mit den Dextrinen an sich zu reißen, ohne die Amylase selbst zu adsorbieren.

Vorversuche.

Als Ausgangspräparat diente Diastase III. Zur Bestimmung des Amylasewertes wurde 1 g Diastase III im Mörser mit etwa 400 ccm Wasser angerieben und auf 500 ccm nach der Filtration aufgefüllt. Hiervon zum Ansatz 2,5 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,3	0
10	6,3	3,2
40	5,7	3,6

$$k = 2,3026 \cdot 1/10 \cdot \log 3,6/0,4 = 2,3026 \cdot 0,095424,$$

$$\text{A.W.} = \frac{2,3026 \cdot 0,0954 \cdot 0,01}{0,04432} = 0,5085.$$

Als Kohlensorten wurden verwandt: 1. Knochenkohle, 2. Tierkohle — alt —, ein Präparat aus der Vorkriegszeit.

Etwa 10 g Diastase III wurden in einer Porzellanschale mit etwa 1 Liter Wasser angerieben und in eine 10-Liter-Weithalsflasche überspült. Durch Zufügen von destilliertem Wasser wurde die Lösung auf ein Gesamtvolumen von 8 Liter gebracht und durch Faltenfilter filtriert. Zu der klaren, gelblichen Lösung wurden etwa 500 ccm Toluol gegeben und 10 Minuten an einer Turbine stark gerührt.

Nach der Teilung der Flüssigkeitsschichten wurden 200 ccm in einen Meßzylinder abgehebert und das Volumen nach Absetzen des Schaumes abgelesen.

200 ccm = 0,25 g Diastase. Dies entspricht der Konzentration 1 : 800. Zur Wertbestimmung wurden wie üblich 4 ccm verwendet.

Ansatz: 4 ccm Diastaselösung (1 : 800)
 6 „ Phosphatmischung ($p_H = 5$)
 + 10 „ 2%ige Stärkelösung
 20 ccm

Hiervon wurden wie üblich 10 ccm zur Titration verwendet:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,0	0	
10	5,7	3,3	gelbbraun

Die Restlösung wurde in ein Becherglas gegossen, 3,75 g Knochenkohle hinzugegeben und 1 Minute an der Turbine gerührt. Diese Kohlenmenge berechnete sich proportional dem Gehalt an Kohlehydraten. Aus den früheren Versuchen berechnete sich für 1 g Diastase II mit 5,56 % Maltose das Maximum von 10 g Tierkohle. Das jetzt verwendete Ausgangspräparat Diastase III enthielt 8,52 % Maltose. Proportional berechnet sich für 1 g Diastase III:

$$\frac{10 \cdot 8,52}{5,56} = 15,0 \text{ Knochenkohle.}$$

Nach dem Absitzen des Kohlenniederschlags wurde durch Faltenfilter filtriert, von dem Filtrat wurden 4 ccm zum Ansatz verwandt:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,3	0	
10	6,0	3,3	braun

Wiederholung des Versuchs mit 2,5 g Tierkohle — alt:

1. 200 ccm = 0,25 g Diastase wurden in ein Becherglas übergespült, 2,5 g Tierkohle hinzugesetzt und 1 Minute an der Turbine gerührt. Die Kohle setzte sich rasch zu Boden. Jetzt wurde durch Faltenfilter filtriert. Das Filtrat war vollkommen wasserklar und zeigte keine Schaumbildung. Zur Prüfung wurden 4 ccm angesetzt:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,2	0	
10	9,2	0	blau

2. Wiederholung des Versuchs mit 1 g Tierkohle — alt: Filtrat wasserklar, schwach schäumend, 250 ccm. Zum Ansatz 5 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,2	0	
10	7,2	2	blauviolett

3. Wiederholung des Versuchs mit 0,5 g Tierkohle — alt: Filtrat stark schäumend, wasserklar. Gesamtvolumen mit Waschflüssigkeit betrug 250 ccm. Zur Bestimmung mußten demnach zum Ansatz 5 ccm verwendet werden:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,2	0	
10	6,3	2,9	gelbbraun

Hauptversuche der Kohlebehandlung nach aseptischer Autolyse.

10 g Diastase III wurden wie oben in 8 Liter Wasser gelöst, mit Xylol überschichtet und 2 Tage bei 40° stehengelassen. Es bildet sich ein feiner kolloider Niederschlag. Bei Behandlung von 200 ccm Autolysat = 0,25 g Diastase mit der vorher bestimmten Höchstmenge von 3,75 g Knochenkohle zeigte die Jodtitration die volle Wirksamkeit der Amylase. Das Filtrat war vollkommen wasserklar und schäumend. Nach etwa sechsständigem Stehen setzte eine weitere Fällung ein, die durch weitere 0,3 g obiger Kohle ohne Verlust beseitigt werden konnte. Der Amylasewert nach zweimaliger Kohlebehandlung betrug 4,07. Die gleiche Behandlung mit 3,4 g Knochenkohle an dem eine Woche gealterten Autolysat lieferte ein Präparat vom Amylasewert = 1,22. Der Stickstoffgehalt betrug etwa 4,6 %.

Es zeigt sich also, daß bei 40° C nach dreimal 24ständiger aseptischer Autolyse das Diastasefiltrat (1 : 800) das beste Präparat lieferte. Bei längerem Altern der Autolysate bei niederer Temperatur tritt eine zu starke Toluolsättigung ein, so daß die Tierkohle infolge der Flotationserscheinung nicht ihre volle Oberfläche entfalten kann.

Der Ansatzversuch wurde wiederholt mit einer frisch bereiteten Lösung (1 : 800), die bei 40° C über der Heizung 3 Tage der Autolyse und der Toluolasepsis überlassen wurde. Nach dreimal 48 Stunden hatte die Lösung gegenüber Methylrot noch nicht dieselbe Farbtiefe wie die Phosphatpuffermischung $p_H = 5$. Erst nach weiteren 6 Stunden ergab der kolorimetrische Vergleich dasselbe $p_H = 5$.

An Stelle der Knochenkohle wurde jetzt mit der alten Tierkohle gearbeitet. 800 ccm zweitägigen Autolysats wurden mit 2 g Tierkohle — alt — behandelt. Das Filtrat schäumte stark und zeigte keine Schädigung der Amylase. Nach weiteren 12 Stunden trat eine erneute Trübung des Filtrats auf. Die Jodtitrationswerte ergaben dieselbe Aktivität. Die trübe Lösung wurde mit weiteren 1,3 g Tierkohle — alt — behandelt. Das wasserklare, stark schäumende Filtrat zeigte einen Amylasewert (A.W.) = 5,8 oder nach *Euler* Vz.F. = 75,4.

Untersuchung des reinsten Präparats.

Die *Stickstoffbestimmungen* nach *Kjeldahl* ergaben 3,4 %. 10 ccm der gereinigten AmylaseLösung — entsprechend 0,83 mg Trockensubstanz — wurden mit 2 ccm 0,1 %iger *Ninhydrinlösung* im Reagenzglas erhitzt. Erst nach längerem Stehen färbte sich die Restlösung schwach violett.

Die *Reaktion auf Kohlehydrate* nach *Molisch* mit α -Naphthol und Schwefelsäure wurde ebenfalls mit 10 ccm ausgeführt und verlief vollkommen *negativ*. Selbst nach längerem Stehen zeigte sich keine Rotfärbung. Die gereinigte Amylase war demnach *frei von Kohlehydraten*.

Zur Bestimmung des *Aminostickstoffs* wurden 500 ccm der gereinigten AmylaseLösung in den eigens hierzu hergestellten Vakuumbirnen auf 50 ccm eingedampft. In 10 ccm wurde nach *van Slyke* das gebildete Stickstoffvolumen gemessen, das gebildete Gasvolumen wurde vollkommen von der alkalischen Permanganatlösung adsorbiert, bestand demnach nur aus Stickoxyd. Demnach enthielt die gereinigte Amylase *keinen Aminostickstoff*.

Protokolle.

10 g Diastase III wurden in einer Porzellanschale abgewogen, mit etwa 2 Liter Wasser angerührt und nach der Filtration durch Papierfilter in einem 10-Liter-Weithalsgefäß auf 8 Liter Gesamtvolumen aufgefüllt.

Nach Zugabe von 500 ccm Xylol wurde etwa 10 Minuten an der Turbine stark gerührt. Das Autolysat blieb 2 Tage bei 40° C stehen. Es bildet sich ein feiner kolloider Niederschlag.

200 ccm des zweitägigen Autolysats (entsprechend 0,25 g Diastase) wurden in ein Becherglas hineinpipettiert, die Flüssigkeit an der Turbine stark gerührt und 3,75 g Knochenkohle auf einmal hinzugegeben. Nach dem Absetzen wird die Kohle durch Faltenfilter abfiltriert, wobei starke Schaumbildung eintritt. Nach Zusammenfallen des Schaumes wird der Kohlenrückstand mit Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit Washwasser im Meßkolben auf 250 ccm aufgefüllt. Zur Bestimmung wurden 5 ccm zum Ansatz verwandt.

Ansatz: 5 ccm Filtrat

10 „ 2%ige Stärkelösung

5 „ Phosphatpuffermischung

20 ccm

Zur Titration wurden wie üblich 10 ccm mit der alkalischen Jodlösung versetzt.

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,2	0	
10	6,3	2,9	gelbbraun

Die Lösung wird nach der ersten Kohlereinigung noch weitere 48 Stunden stehengelassen. (Flüssigkeit milchig getrübt.) Zur Prüfung wurden wie oben 5 ccm verwandt:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,2	0	
10	6,3	2,9	gelbbraun

Durch das weitere Altern und die erneut auftretende Trübung ist demnach keine Schädigung eingetreten. Zur Beseitigung der neuen Trübung wurden 240 ccm der nochmals gealterten Diastaselösung im Becherglas an der Turbine gerührt und mit 0,3 g Knochenkohle versetzt.

Das Filtrat war jetzt vollkommen wasserklar und schäumend. Das Gesamtvolumen betrug mit Washwasser 255 ccm. Zur Bestimmung wurden angesetzt $5 \cdot 240/200 = 5,4$ ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,2	0	
10	6,3	2,9	gelb

$$k = 2,3026 \cdot 1/10 \cdot \log 3,6/0,7 = 0,2196.$$

Bestimmung der Trockensubstanz.

10 ccm der gereinigten Diastaselösung wurden in einer Porzellanschale im Vakuumtrockenschrank allmählich eingedunstet und im Exsikkator

über Schwefelsäure bis zur Konstanz getrocknet. Die Bestimmung der Trockensubstanz ergab:

$$\begin{aligned} &\text{In 10 ccm 0,001 g} \\ &\text{In 5,4 ccm } \frac{0,01 \cdot 5,4}{10} = 0,54 \text{ mg.} \end{aligned}$$

Demnach:

$$\text{Am.W.} = \frac{0,2196 \cdot 0,01}{0,0054} = 4,1.$$

$$\text{Vz.F. (Euler) } 13 \cdot \text{Am.W.} = 53,3.$$

Wiederholung der Behandlung mit Knochenkohle an älteren Autolysaten.

1 g Diastase III wurde in einer Porzellanschale mit etwa 150 ccm Wasser angerührt, durch Faltenfilter filtriert und im Meßkolben nach dem Absetzen des Schaumes auf 200 ccm aufgefüllt. Die Lösung wurde in ein Becherglas überführt, mit etwa 50 ccm Toluol versetzt und an der Turbine 15 Minuten lang gerührt. Die Flüssigkeit blieb bei 40° C eine Woche lang stehen. Es hatte sich ein trüber, feiner Niederschlag gebildet. 50 ccm dieser Lösung wurden herauspipettiert und in einer kleinen Glasstöpselflasche mit 3,75 g ausgeglühter Knochenkohle an der Maschine 2 Minuten geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde nach dem Absetzen der Kohle durch ein kleines Faltenfilter filtriert. Nach dem Nachlassen der Schaumentwicklung wurde der Kohlerückstand mit wenig Wasser nachgewaschen. Filtrat nebst Waschwasser betrug 70 ccm. Entsprechend 5 mg Ausgangspräparat wurden zur Wertbestimmung 1,4 ccm angesetzt:

$$\begin{array}{rcl} \text{Ansatz:} & 1,4 \text{ ccm} & \text{Kohlefiltrat} \\ & 8,6 \text{ „} & \text{Phosphatmischung} \\ & 10,0 \text{ „} & 2\% \text{iger Stärkelösung} \\ \hline & 20,0 \text{ ccm} & \end{array}$$

Zur Titration wurden wie üblich je 10 ccm der alkalischen Jodlösung zugesetzt.

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,0	0	
10	6,2	2,9	rot

Zur Bestimmung der Trockensubstanz wurden 14 ccm des Filtrats in einer Porzellanschale im Vakuum vorsichtig eingedunstet und nach Trocknen über Schwefelsäure bis zur Konstanz das Gewicht bestimmt. Die Bestimmung ergab 0,0018 g.

Demnach waren in der Bestimmungsprobe 1,4 ccm = 1,8 mg T.S.,

$$k = 0,23026 \cdot \log 3,6 \cdot 0,6 = 0,102$$

oder

$$\text{A.W.} = \frac{0,102 \cdot 0,01}{0,0018} = 1,22.$$

$$\text{Vz.F. (Euler)} = 15,86.$$

Die Stickstoffbestimmung ergab 4,6% N in der Trockensubstanz.

Wiederholung der Versuche mit *alter Tierkohle* ergab ein noch besseres Resultat.

1 g Diastase III wurde in einer Porzellanschale mit wenig Wasser angerieben und nach Absetzen des Schaumes in einem Meßzylinder auf 800 ccm aufgefüllt und durch Faltenfilter filtriert. Die gelbe Lösung wurde in einem Becherglas mit etwa 200 ccm Xylol 10 Minuten stark an der Turbine gerührt. Die Mischung blieb dreimal 48 Stunden über der Heizung bei 40° C stehen. Die Reaktion ist gegen Lackmus noch schwach sauer. Gegen Methylrot noch nicht dieselbe Farbtiefe wie die Phosphatmischung ($p_H = 5$). Nach weiteren 6 Stunden hat die Reaktion gegen Methylrot dieselbe Farbtiefe wie die Pufferlösungen. Das Autolysat ist milchig trübe.

Erste Kohlebehandlung.

800 ccm des Autolysats (1,0 Diastase) werden im Becherglas mit 2 g der alten Tierkohle 2 Minuten stark an der Turbine gerührt. Nach dem Absitzen des Schaumes wird durch Faltenfilter filtriert und der Filtrückstand mit Wasser nachgewaschen.

Das Filtrat mit Waschwasser beträgt 1000 ccm. Demnach ist die jetzige Konzentration 1:1000. Entsprechend der üblichen Messung eines 5 mg Ausgangspräparat äquivalenten Volumens wurden zum Ansatz 5 ccm verwendet:

Ansatz: 5 ccm Filtrat
 5 „ Phosphatmischung
 10 „ 2%ige Stärkelösung.

Zur Titration wie üblich 10 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,2	0	
10	6,5	2,9	gelbbraun

Nach weiteren 24 Stunden tritt eine erneute Trübung auf.

Zweite Kohlebehandlung.

Das Filtrat der ersten Kohlebehandlung (1000 ccm 1 g Diastase) wird im Becherglas stark turbiniert und nochmals 1,3 g der alten Tierkohle hinzugegeben.

Filtrat 1200 ccm. Zum Ansatz 6 ccm:

Minuten	Thiosulfat	Jod
0	9,2	0
10	5,8	3,4

Berechnung von k .

$$k = 1/10 \cdot 2,3026 \cdot \log 3,6/0,2 = 0,2901.$$

Die Bestimmung der Trockensubstanz ergab:

$$\text{In } 60 \text{ ccm} = 0,0050 \text{ g,}$$

$$,, \quad 6 \quad ,, = 0,0005 \text{ g.}$$

Amylasewert:

$$\text{A.W.} = \frac{k \cdot 0,01}{0,0005} = \frac{0,2901 \cdot 0,01}{0,0005}$$

$$\text{A.W.} = 5,8,$$

$$\text{Vz.F.} = 75,4.$$

Stickstoffbestimmung des reinsten Präparats:

$$250 \text{ ccm} = \frac{0,5 \text{ mg} \cdot 250}{6} = 0,02085 \text{ g Amylase}$$

wurden nach *Kjeldahl* verascht.

$$\text{Vorgelegt } 25 \cdot 0,827 = 20,7 \text{ ccm n/50 HCl}$$

$$\text{Zurücktitriert} \quad 17,9 \quad ,, \quad \text{n/50 HCl}$$

$$2,8 \text{ ccm n/50 HCl}$$

$$\text{N} = \frac{2,8 \cdot 0,28 \text{ mg} \cdot 100}{0,02085} = 3,8 \%$$

Tierkohlebehandlung an älteren Autolysaten.

0,25 g Diastase III wurden zu etwa 200 ccm gelöst, bei Zimmer-temperatur 9 Tage bei Toluolschutz autolysiert. Im Becherglas wurde stark turbiniert und 0,5 g Tierkohle hinzugegeben. Nach 1 Minute langem Rühren wurde durch Faltenfilter filtriert.

Filtrat wurde mit Waschwasser aufgefüllt auf 250 ccm. Entsprechend der üblichen Wertbestimmung, bezogen auf 5 mg Ausgangspräparat, wurden wieder zum Ansatz 5 ccm verwandt:

$$\begin{array}{l} \text{Ansatz:} \quad 5 \text{ ccm Kohlenfiltrat} \\ \quad + 5 \quad ,, \quad \text{Phosphatmischung} \\ \quad + 10 \quad ,, \quad 2\% \text{ige Stärkelösung} \\ \hline \quad \quad 20 \text{ ccm} \end{array}$$

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,4	0	
10	6,8	2,6	rotviolett

Das Filtrat blieb, mit Toluol gesättigt, weitere 12 Stunden stehen. Nach Turbinieren wurden wieder 0,1 g Kohle zur Beseitigung der neuen Trübung hinzugegeben.

Filtrat + Waschwasser beträgt 350 ccm. Zum Ansatz 7 ccm. Reaktion sauer gegen Methylrot.

Minuten	Thiosulfat	Jod	Farbe
0	9,5	0	
10	6,2	3,3	braun

Die Bestimmung der Trockensubstanz des Filtrats ergab:

In 14 ccm = 0,0036.

„ 7 „ = 0,0018.

Daher:

$$\text{Am.W.} = \frac{0,024896 \cdot 0,01}{0,0018} = 1,38.$$

$$\text{Vz.F.} = 18,94.$$

Ergebnis.

Die zur Reinigung der Amylase benutzten Ausgangspräparate — Diastase *Merck* — stellten ein gelbes Pulver dar, das zu etwa 50 % in Wasser löslich war. Der Stickstoffgehalt der Ausgangspräparate schwankte zwischen 5 und 8 %. Ferner enthielten die Präparate höhermolekulare Kohlehydrate, die sich durch ihre Löslichkeit in Alkohol von 50 Vol.-% und starke Reduktionswirkung als Erythrodextrine kennzeichneten. Das letzte Präparat mit etwa 8 % Gesamtstickstoff enthielt etwa 9 % Kohlehydrate als Maltose berechnet. Die Lösungen reduzierten *Fehlingsche* Lösung und gaben starke Ninhydrinreaktion. Der Amylasewert dieser Präparate betrug im Durchschnitt 0,2 bis 0,5. Ferner gaben die Ausgangslösungen sämtlich eine starke Peroxydase-reaktion mit Benzidin und Wasserstoffsuperoxyd, was auf das Vorhandensein der die Amylase begleitenden Peroxydase zurückzuführen ist. Die Adsorptionsversuche mit Kaolin, Zinnsäure und Aluminiumhydroxyd klärten über das Adsorptionsverhalten der Amylase auf. Aus dem Aluminiumhydroxydadsorbat war die Amylase durch sekundäres Phosphat ohne Verlust eluierbar. In der Restlösung blieben etwa 50 % unwirksamer Substanz zurück. Bei der Adsorption mit Zinnsäuresuspension wurden sogar 70 % unwirksamen Rückstands abgetrennt. Dagegen zeigten die Elutionen aus Kaolin und noch stärker aus Zinnsäure starke Inaktivierung der Amylase. Die sauren Kolloide, wie Kaolin und besonders Zinnsäure, trennen aus der Amylase anscheinend einen Begleitstoff ab, der der Amylase als Schutzstoff dient und für die Beständigkeit des Ferments notwendig ist. Das stärker basische Aluminiumhydroxyd nimmt diesen Schutzstoff bei der Adsorption mit. Die Adsorption an gallertiges Zinkphosphat gelang nur unter Zusatz von etwa 20 % Alkohol, der dem Gel als Schutzstoff dient. Die Überführung in das kristalline Zinkphosphat erforderte aber zu lange Zeit, in der die Amylase zum größten Teile inaktiviert wurde.

Ferner zeigte sich, daß die Amylase nach der Verzuckerung von Stärke aus dem Maltosekomplex restlos adsorbierbar und eluierbar ist. Nach längerem Erhitzen auf 50° C bleibt die noch nicht geschädigte Amylase adsorbierbar, ist jedoch nicht mehr zu eluieren. Die Adsorption tritt in diesem Falle an einer aktiven, ungeschützten Gruppe des Ferments selbst ein und führt zu dessen Inaktivierung.

Es wurde deshalb ein neuer Weg zur Isolierung der Amylase eingeschlagen.

Diastaselösung, unter Verschuß aufbewahrt, zeigte noch nach 8 Tagen Alterung ihre volle Aktivität, obwohl die Lösung vollkommen trübe und übelriechend geworden war. Die Messung der Reaktionskonstante ergab dieselbe Aktivität wie die frisch bereitete Ausgangslösung. Wurden aber Lösungen in offenen Gefäßen aufbewahrt, so zeigte die Lösung schon nach mehreren Stunden keine Wirkung mehr, infolge der zersetzenden Tätigkeit hineingelangter Bakterien. Um den bakteriellen Einfluß vollkommen auszuschalten, wurden die Lösungen stark mit Toluol gerührt und blieben mit einer Toluolschicht bedeckt.

Es handelt sich hier wahrscheinlich um eine langsame Loslösung der Amylase von den assoziierten Eiweißstoffen. Der entstehende feine, kolloidale Niederschlag geht selbst durch gehärtete Filter und Kollodiummembranen. Die Beseitigung der losgelösten Begleitstoffe zusammen mit den Dextrinen erfolgte durch Adsorption an Tierkohle. Als bestes Kohlepräparat erwies sich eine alte, aus der Vorkriegszeit stammende Kohle von sehr hohem spezifischen Gewicht und hohem Aschengehalt, der sich nach dem Ausglühen der Kohle durch einen grauen Rückstand zu erkennen gab. Die Messung der Aktivität der Amylase erfolgte jedesmal vor und nach der Kohlebehandlung.

Um die Autolyse zu beschleunigen, wurde in stark verdünnten Lösungen gearbeitet und bei einer Temperatur von 40° C. Am intensivsten wirkte die Tierkohle bei einem dreitägigen Autolysat (40° C) unter Toluolschutz. Der Säuregrad des Autolysats steigt nicht über $p_H = 5$. Bei längerem Stehen der Autolysate bei niedriger Temperatur (20° C) tritt eine stärkere Sättigung der wässerigen Lösungen mit Toluol ein. Werden diese stärker mit Toluol gesättigten, wässerigen Lösungen dann mit Kohle behandelt, so ballt sich die Tierkohle in Klümpchen zusammen, infolge der Flotationerscheinung, und kann dann nicht mehr ihre volle Wirksamkeit entfalten. Außerdem scheint gerade die optimale Wasserstoffionenkonzentration ($p_H = 5$) für die Stabilität der Amylase und deren Trennung von den assoziierten Ballaststoffen besonders günstig zu sein.

Das nach dreitägiger Autolyse bei 40° C mit Tierkohle zweimal fraktioniert behandelte Amylasefiltrat war vollkommen wasserklar

und schäumte stark. Der Amylasewert betrug 5,8, die Verzuckerungsfähigkeit nach *Euler* Vz.F. = 75,4. Der Stickstoffgehalt war von 8 auf 3,8% gesunken. Das Präparat war vollkommen frei von reduzierenden Kohlehydraten. Sogar die höchstempfindliche Reaktion nach *Molisch* war vollkommen negativ. Nur eine ganz schwache Ninhydrinreaktion zeigte noch Spuren von Eiweißabbaustoffen an.

Durch die zweimalige Kohlebehandlung nach aseptischer Autolyse gelingt es, den Wirkungsgrad der Amylase vom Amylasewert 0,2 bis 0,5 auf einen Amylasewert von 5,8, also etwa auf das 12- bis 30fache des Ausgangspräparats zu steigern. Da anzunehmen ist, daß die in der Technik als Ausgangspräparate verwandten Diastaseauszüge die Amylase in teilweise inaktiviertem, aber noch kolloid-stabilem Zustande enthalten, so dürfte sich die Methode der Kohlereinigung nach aseptischer Autolyse an frischen Malzauszügen zugunsten bedeutend höherer Wirkungsgrade noch erfolgreich ausbauen lassen. Vielleicht gelingt es, durch geeignete Auswahl der Tierkohlen fraktioniert die Begleitstoffe vollständig zu entfernen.

Die Methode hat gegenüber den bisherigen Adsorptionsmethoden den Vorteil, daß die Amylase frei von Salzen wie sekundären Phosphaten, die zur Elution der Amylase nach den Adsorptionsmethoden gebraucht werden, erhalten wird. Besonders für die hochdispersen Malzamylosen, die durch die meisten Dialysiermembranen durchdiffundieren, ist diese Methode von besonderem Wert. In einem Falle gelang es sogar, die Amylase (Vz.F. = 9,1) nach dem Eindampfen in Form weißer Blättchen zu isolieren, die sich klar im Wasser lösten. Die Methode der Kohlebehandlung nach aseptischer Autolyse hat ferner den Vorteil, daß die jedesmalige Anstellung der alkalischen Elutionen auf die optimale Acidität fortfällt.

Ferner gelingt es durch diese Methode, die Amylase *vollkommen frei von Kohlehydraten* zu erhalten. Inwieweit das noch die Ninhydrinreaktion gebende Peptid als Begleitstoff für die Beständigkeit oder als kolloider Träger der Amylase in Betracht kommt, ist noch zu untersuchen.

Literatur.

1) Wochenschr. f. Brauerei **42**, 97, 103, 110, 1925. — 2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **112**, 191, 1920/21. — 3) Fermentforschung **5**, 196, 1921/22. — 4) R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und A. P. F. Hesse, Zeitschr. f. physiol. Chem. **126**, 143. — 5) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **112**, 191, 1920/21. — 6) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **51**, 780, 1980. — 7) Ber. **57**, 58, 1924. — 8) E. Waldschmidt-Leitz, „Die Enzyme“. Braunschweig, Verlag Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., 1926. — 9) Diese Zeitschr. **27**, 349, 1910. — 10) Ebendasselbst **144**, 212, 1923. — 11) Ebendasselbst **27**, 349, 1910.

Über das Verhalten saurer und alkalischer Böden im Joddüngungsversuch.

Von
Th. von Fellenberg.

(Aus dem Laboratorium des eidgenössischen Gesundheitsamtes.)

(Eingegangen am 8. Juli 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Vor einiger Zeit¹ wurde über einen Joddüngungsversuch mit Runkelrüben berichtet, bei welchem es sich gezeigt hatte, daß diese Pflanzen auf Joddüngung zwar nicht durch einen Mehrertrag an Kraut und Wurzeln reagierten, wohl aber durch eine allerdings nur recht geringe Mehraufnahme an Jod.

Einen Erntemehrertrag wollte *J. Stoklasa*² bei der Zuckerrübe festgestellt haben. *M. von Wrangell*³ unternahm an der landwirtschaftlichen Hochschule in Hohenheim in den Jahren 1924 bis 1926 eine Reihe von Kulturversuchen mit mehr als einem Dutzend verschiedener Pflanzen, ohne irgendwelche Ertragssteigerungen feststellen zu können. Hingegen konnten *K. Scharrer* und *A. Strobel*⁴ starke Jodanreicherung bei allen von ihnen untersuchten Pflanzen feststellen bei Verwendung eines sauren und eines neutralen Bodens (p_H 5,45 und 6,57).

Die hier zu besprechenden Topfversuche wurden im Sommer 1926 durchgeführt. Es handelte sich darum, die Wirkung der Joddüngung auf ein und dieselbe Pflanze bei verschiedenen Böden zu untersuchen, und zwar sollte einerseits festgestellt werden, ob der Ernteertrag dadurch beeinflußt würde, andererseits, ob das durch die Pflanzen aufgenommene Jod je nach der Bodenart variere.

Zwei wichtige Eigenschaften der Böden dürften bestimmend sein für die Jodaufnahme der Pflanzen, ihr Adsorptionsvermögen für Jod und ihre katalytische Wirkung, d. h. ihre Eigenschaft, Jodionen

¹ Diese Zeitschr. **160**, 210, 1925.

² C. r. **128**, 120, 1924.

³ Das Jod als Pflanzennährstoff. Die Naturwissenschaften **15**, 70.

⁴ Angewandte Botanik. Zeitschr. f. Erforsch. d. Nutzpflanzen **9**, 187, 1927.

in elementares Jod überzuführen. Es ist a. a. O.¹ gezeigt worden, daß die Böden diese Eigenschaft in sehr verschiedenem Grade besitzen, und daß sich besonders saure und eisenreiche Böden durch eine hohe katalytische Wirkung auszeichnen.

Über die Adsorption des Jodions habe ich auch bereits früher² einige Versuche angestellt. Die Versuchsanordnung war aber damals nicht einwandfrei gewesen. Ich suchte deshalb, durch neue Versuche das Adsorptionsvermögen einiger Materialien für Jod festzustellen, und zwar verwendete ich dazu geglühte Kieselgur, Kaolin, gefälltes Calciumcarbonat und Tierkohle. Die Versuche wurden mit Jodion und mit elementarem Jod durchgeführt.

Zu den Adsorptionsversuchen mit Jodion wurden je 25 ccm KJ-Lösung, enthaltend 0,4 mg KJ, entsprechend 0,306 mg J, mit 0,1 g der Adsorbentien in Reagenzgläsern mit Glasstöpsel unter zeitweiligem Umschwenken stehen gelassen. Die Gläser waren nahezu ganz gefüllt, so daß die Möglichkeit, daß etwa während der Versuchszeit bei der Probe mit Kieselgur elementares Jod auftrat, auf ein Minimum reduziert war.

Nach 2 Stunden wurde die Flüssigkeit durch Zentrifugieren abgetrennt und der Rückstand zweimal mit je 10 ccm Wasser aufgeschüttelt und aus-zentrifugiert. Nun wurden die Rückstände mit 3 Tropfen gesättigter Pottaschelösung und 10 ccm Wasser $\frac{1}{2}$ Stunde im Wasserbad erhitzt, um das adsorbierte Jod wieder herauszulösen. Man trennte die Flüssigkeit wieder durch Zentrifugieren ab und bestimmte darin das Jod.

Man fand für die Adsorption von Jodion aus 25 ccm 0,0016 %igen KJ-Lösungen (0,0012 % J) an je 0,1 g Adsorbens folgende Werte:

Geglühte Kieselgur	Kaolin	Calciumcarbonat	Tierkohle
0,55 γ 0,18 %	0,25 γ 0,08 %	0,6 γ 0,20 %	56,0 γ 18,3 %

Entsprechende Versuche wurden mit wässriger Jodlösung ausgeführt. Etwas Jod wurde mit wärmern, destilliertem Wasser geschüttelt, filtriert und die Lösung abgekühlt. Je 25 ccm der Lösung wurden mit 0,1 g der oben genannten Materialien $\frac{1}{2}$ Stunde geschüttelt. Die weitere Verarbeitung geschah in gleicher Weise wie beim vorhergehenden Versuch. Der Jodgehalt der Lösung betrug 0,277 mg in 25 ccm, also nahezu gleich viel, wie beim Versuch mit Kaliumjodid.

Man fand für die Adsorption von elementarem Jod aus 25 ccm dieser 0,0011 %igen wässrigen Jodlösung

Geglühte Kieselgur	Kaolin	Calciumcarbonat	Tierkohle
1,0 γ 0,36 %	1,9 γ 0,69 %	2,5 γ 0,90 %	43,0 γ 15,6 %

¹ Th. von Fellenberg, H. Geilinger und K. Schweizer, Über das Freiwerden elementaren Jods aus Erde. Diese Zeitschr. 152, 172, 1924.

² Diese Zeitschr. 152, 166, 1924.

Wir sehen, daß Tierkohle sowohl Jodion als auch elementares Jod weitaus am besten adsorbiert. Die untersuchten mineralischen Adsorptionsmittel nehmen elementares Jod besser auf, als ionisiertes. Da der hier nicht näher berücksichtigte Dispersionsgrad für die Adsorption mitbestimmend ist, sollen die Unterschiede zwischen Kieselgur, Kaolin und Calciumcarbonat nicht näher erörtert werden. Wir begnügen uns einstweilen mit der Feststellung, daß alle drei Materialien Jod in ähnlicher Größenordnung festhalten.

Die Kulturversuche wurden in der Vegetationsanlage der schweizerischen agrikulturchemischen Anstalt Bern-Liebefeld durchgeführt. Die näheren Bedingungen betreffend Sortenwahl, Wahl der Böden, Kulturbedingungen wurden in einer Konferenz gemeinsam mit den Herren Dr. *F. Keller*, Dr. *Ritter* und Dr. *Truninger* besprochen. Dr. *Keller* leitete die Kulturversuche. Herrn Dr. *Schmid* spreche ich für die Ermöglichung dieser Untersuchungen, den genannten Herren für ihre Beihilfe meinen besten Dank aus.

Als Versuchspflanze wurden *Karotten* gewählt. Die Aussaat geschah am 12. April 1926 in Töpfen von 20 cm Höhe und 20 cm Durchmesser auf folgenden vier Böden, die mit Phosphor, Kali und Stickstoff gedüngt worden waren:

- I. Boden vom Liebefeld, Magerland, diluvialer Schotter.
- II. Boden vom Pâturage du Droits-Malleray.
- III. Boden von Sägerütti, Münsingen, Alluvialboden.
- IV. Gartenkomposterde der Gärtnerei Z., Liebefeld.

(Wir werden die Böden in Zukunft gelegentlich nur mit diesen Ziffern bezeichnen.)

Mit jedem der drei ersten Böden wurden sechs Versuche an- gestellt, und zwar:

A. Ohne Stallmist.

- 1. Mit Karotten, ohne Jod,
- 2. mit Karotten, mit Jod,
- 3. unbepflanzt, mit Jod.

B. Mit verrottetem Stallmist (94 g pro Topf).

- 4. Mit Karotten, ohne Jod,
- 5. mit Karotten, mit Jod,
- 6. unbepflanzt, mit Jod.

Bei der Komposterde ließ man die Versuche mit Stallmist (4 bis 6) weg.

Die Versuche 1, 2, 4 und 5 wurden mit je zwei Töpfen vorgenommen. Die Leerversuche (3 und 6) mit je einem Topf, sie sollten dazu dienen, sich über den Verbleib des zugesetzten Jods zu orientieren.

Der Jodzusatz war bei den Versuchen 2, 3, 5 und 6 stets derselbe; er betrug $0,0157 \text{ g KJ} = 0,012 \text{ g J pro Topf}$ von etwa 6 kg Erde oder etwa

2 mg pro Kilogramm frischer Erde. Das in die Töpfe eingebrachte Gewicht der Erden differierte jedoch bei den verschiedenen Böden ziemlich stark. Die genaue Jodmenge pro Topf ergibt sich aus der folgenden Tabelle.

Tabelle I. Jodzusatzen zu den verschiedenen Böden.

Boden	Wassergehalt der eingefüllten Erde %	Erde pro Gefäß		Jodzusatzen pro kg trockene Erde mg
		eingefüllt g	trocken g	
I	15,2	6000	5090	2,36
II	18,8	5200	4220	2,84
III	21,0	5700	4500	2,67
IV	21,6	4800	3760	3,19

Das Jod wurde den Pflanzen am 11. Mai 1926 als Kopfdüngung gegeben.

Zur Charakterisierung unserer Erden wurden verschiedene Bestimmungen ausgeführt, vor allem die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration und des Jodabspaltungsvermögens.

Die elektrometrische p_H -Bestimmung verdanke ich der Liebenswürdigkeit von Herrn K. Keller, Liebefeld. Sie wurde in wässriger Lösung, sowie auch in doppelt normaler KCl-Lösung durchgeföhrt. Letztere Bestimmung gibt bekanntlich auch die Austauschazidität bzw. die potentiellen Wasserstoffionen an.

Man fand folgende Werte:

	p_H in wässriger Lösung	p_H in 2 n KCl-Lösung
I. Boden Liebefeld	4,5	4,8
II. „ Droits-Malleray	4,4	4,8
III. „ Münsingen	7,2	7,1
IV. „ Komposterde Liebefeld .	7,3	7,3

Wir haben also zwei ausgesprochen saure und zwei alkalische Böden.

Man ging nun dazu über, die Erden in bezug auf ihre katalytische Wirkung, ihre Eigenschaft, aus zugesetztem Alkalijodid Jod in Freiheit zu setzen, miteinander zu vergleichen. Man verwendete dazu die gesiebten Erden. Beim Sieben durch ein Haarsieb von 1 mm Maschenweite blieben als Steine zurück bei

I. Erde	II. Erde	III. Erde	IV. Erde
3,1 %	0 %	1,8 %	26,4 %

Man prüfte zuerst die Liebefeld-Erde I bei steigenden Konzentrationen an KJ. Man ging dabei anders vor als früher (l.c.). Die Versuche wurden

in weithalsigen Stöpselflaschen von 200 ccm Inhalt mit je 10 g Erde durchgeführt. Man wägt die gewünschte Menge KJ hinein, fügt 2,5 ccm Wasser hinzu und schüttelt nach erfolgter Lösung 10 g lufttrockene Erde auf einmal dazu. Die Erde befeuchtet sich nicht sofort ganz, sondern erst nach einigem Schütteln. Nach Verlauf einiger Minuten kann man sie durch weiteres Schütteln vom Boden loslösen und fein verteilen. Die Erde ist also nur feucht, nicht naß und soll keine Knollen haben, damit die Luft gut zwischen ihre Poren eindringt.

Die Flaschen werden im Dunkeln aufbewahrt. Nach 24 Stunden fügt man 25 ccm Wasser hinzu, schüttelt um und filtriert durch ein Filter von 9 cm Durchmesser. Das Filtrat wird gemessen, das Jod darin bestimmt und auf die ursprünglichen 27,5 ccm Flüssigkeit umgerechnet. Durch Division durch 10 erhält man das durch 1 g Erde in 24 Stunden in Freiheit gesetzte Jod.

Die Jodbestimmung in den Filtraten wurde je nach ihrem Jodgehalt verschieden ausgeführt. Ist das Filtrat stark gelb gefärbt, so kann es direkt titriert werden; ist es schwach gelb gefärbt, so schüttelt man es mehrmals mit Chloroform aus und titriert nach *Fresenius*; bei noch kleineren Mengen führt man das Jod von der Chloroformlösung in einen Tropfen Pottaschelösung über, verbrennt und bestimmt auf gewöhnliche Weise.

In der folgenden Tabelle sind die Resultate zusammengestellt.

Tabelle II.

Jodentwicklung aus Erde Nr. I, Liebefeld, bei steigendem Kaliumjodid-zusatz während 24 Stunden.

KJ in % der Erde	Entwickeltes Jod in γ pro g Erde in 24 Std.
0,5	33
1	107
2,5	282
5	374
10	445
20	590

In der folgenden Abbildung sind die Werte graphisch dargestellt.

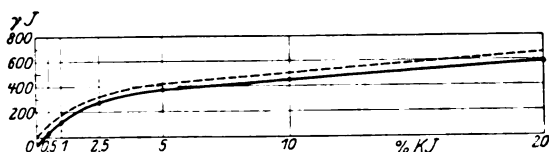


Abb. 1.

Im Anfang steigt die Jodentwicklung mit zunehmender Jodidkonzentration stark an, später, von etwa 5 % Jodid an, nur noch schwach, und zwar vollständig regelmäßig. Die höheren Konzentrationen eignen sich also zur Vergleichung am besten. Mit 2,5 % nähert man sich schon sehr der Geraden. Man entschloß sich, diese Konzentration für die folgenden Bestimmungen an den übrigen Erden zu wählen.

Wenn wir den Anfang der Kurve sinngemäß einzeichnen, so fängt sie nicht mit dem Nullpunkt an, sondern mit einem Wert von ungefähr -70γ . Das scheint darauf hinzudeuten, daß die ersten 70γ Jod, welche entwickelt werden, wieder verschwinden, indem sie offenbar von der Erde adsorbiert werden. Ob dieser Adsorption eine Reduktion zu HJ oder eine Bindung an organische Substanzen folgt, läßt sich nicht ohne weiteres voraussagen. Die wirklich gebildete Jodmenge dürfte der punktierten Kurve entsprechen, welche beim Nullpunkt beginnt.

Man untersuchte nun die übrigen Erden in gleicher Weise unter Zusatz von $2,5\%$ KJ, indem man die Reaktion 24 und dreimal 24 Stunden gehen ließ. In einem Falle wurde eine Erde mit 10% verrottetem Stallmist versetzt und dreimal 24 Stunden einwirken gelassen. Ferner prüfte man einige Mischungen gleicher Teile der Erden miteinander. Die folgende Tabelle gibt die erhaltenen Resultate wieder.

Tabelle III.

Jodentwicklung aus Erden bei $2,5\%$ Kaliumjodidzusatz.

Erde	Gluhverlust %	Entwickeltes Jod in γ pro g Erde	
		in 24 Std	in 3×24 Std.
I	4.34	282	472
II	9.30	61	99
III	7.32	2.5	2.1
IV	10.69	2.4	2.0
I + 10% Stallmist	—	—	4.2
I + II	—	73	—
I + III	—	1.7	—
I + IV	—	1.7	—

Wir sehen, daß außer der I. auch die II. Erde noch beträchtlich Jod in Freiheit setzt, obschon etwa viermal weniger. Die III. und IV. Erde hingegen entwickeln nur ganz geringe Spuren. Die Reaktion geht Hand in Hand mit der Wasserstoffionenkonzentration. Bei den Erdmischungen ist p_H nicht bestimmt worden. Da aber die beiden alkalischen Böden karbonatreich sind, muß dadurch das p_H entsprechend heraufgebracht worden sein, so daß ohne Zweifel auch hier hohe Werte von p_H einer geringen katalytischen Wirkung entsprechen. Durch die Mischung der sauren Erde mit 10% Stallmist ist die Wirkung nahezu aufgehoben. Auch hier dürften Ammoniak und andere Basen das p_H erhöht haben. Außerdem verringert aber die Gegenwart organischer Stoffe die beobachtbare Jodentwicklung stets erheblich, indem das entwickelte Jod adsorbiert, wie wir das bei den Adsorptionsversuchen mit Tierkohle gesehen haben, und in einem weiteren Stadium chemisch gebunden wird. Wenn wir ferner berücksichtigen, daß auch der Gehalt

an speziell katalytisch wirkenden Stoffen, wie Eisen- und Manganverbindungen, und der Dispersitätsgrad in Betracht fällt, so können wir natürlich nicht erwarten, daß die Jodentwicklung stets streng parallel den p_H -Werten verläuft. Die Wasserstoffentwicklung ist nur ein Faktor unter mehreren, und zwar offenbar der ausschlaggebendste.

Die Ernte erfolgte am 3. August. Die Pflanzen waren im Aussehen normal, außer den Wurzeln bei Boden I ohne Stallmist mit Jodgebe. Diese Wurzeln waren in beiden Gefäßen teilweise angefault. Da sowohl der entsprechende Versuch ohne Jod, als auch der entsprechende Versuch mit Jod und mit Stallmist diese Schädigung nicht zeigten, ist man versucht, anzunehmen, daß die Joddüngung bei dieser Erde die Pflanzen in ihrer Widerstandskraft schwächte, daß aber diese Schwächung durch die Gegenwart des Stallmistes wieder aufgehoben wurde. Da wir nun weiter oben gezeigt haben, daß gerade diese Erde sich durch eine außerordentlich starke katalytische Wirkung auszeichnet, wie wir sie weder bei diesen Versuchen, noch früher bei irgend einer Erde in dem Maße angetroffen haben, und da diese katalytische Wirkung durch Stallmist stark herabgesetzt wird, liegt die Vermutung nahe, daß die Schädigung durch frei werdendes elementares Jod erfolgt. Eine solche Wirkung wird natürlich nur in ganz seltenen Fällen eintreten können.

Das Ergebnis der Ernte wird durch folgende Tabelle wiedergegeben.

Tabelle IV.

Ernteergebnis in Gramm frischer Substanz pro Topf zu etwa 6 kg Erde.

Einbringen von		Kraut			Wurzeln		
Stallmist	Jod	Gewicht	Schwankung	Jodeffekt	Gewicht	Schwankung	Jodeffekt
I. Boden vom Liebefeld.							
—	—	181	± 3	— 29	607	± 49	— 29
—	+	152	± 1,5		578	± 8,5	
+	—	193	± 5,5	— 7	685	± 17	+ 46
+	+	186	± 1		731	± 11,5	
II. Boden vom Pâturage du Droits-Malleray.							
—	—	96	± 8	— 14	421	± 22,5	+ 10
—	+	110	± 2		437	± 20	
+	—	130	± 0	— 6	486	± 59	+ 9
+	+	136	± 6		495	± 25	
III. Boden von Sägerütti, Münsingen.							
—	—	241	± 4,5	+ 3	706	± 32	— 39
—	+	244	± 4		667	± 21	
+	—	227	± 7	+ 1	732	± 10	— 47
+	+	228	± 9,5		685	± 10	
IV. Gartenkomposterde der Gärtnerei Z., Liebefeld.							
—	—	206	± 8	— 12	884	± 97	+ 78
—	+	194	± 6,5		962	± 24	

Eine deutliche Wirkung der Joddüngung auf den Ernteertrag ist bei keiner der Erden, weder bei den Versuchen ohne, noch bei denen mit Stallmist festzustellen, wie wir eine solche auch bei unserem früheren Feldversuch mit Runkelrüben nicht hatten nachweisen können. Dieses Resultat stimmt also auch mit den diesbezüglichen Resultaten von *M. von Wrangell* völlig überein.

Über die Frage nach der Jodaufnahme durch die Pflanzen gibt uns unsere nächste Tabelle Auskunft.

Tabelle V.
Jodgehalt der Ernte.

Einbringen von		γ J im kg frischer Subst.		γ J pro Topf			Mehrertrag an Jod		
Stallmist	Jod	Kraut	Wurzeln	Kraut	Wurzeln	Summe	Kraut	Wurzeln	Summe
I. Boden vom Liebefeld.									
—	—	38	40	6,7	24,4	31,1			
—	+	610	72	93,2	41,5	134,7	86,3	17,1	103,6
+	—	74	40	14,3	27,4	41,7			
+	+	550	62	102,2	45,5	147,7	187,9	18,1	206,0
II. Boden vom Pâturage du Droits-Malleray.									
—	—	47	22	4,6	9,3	13,9			
—	+	350	38	38,5	20,8	59,3	33,9	11,5	45,4
+	—	96	25	12,5	12,2	24,7			
+	+	260	38	35,5	18,8	54,3	17,0	6,6	23,6
III. Boden von Sägerütti, Münsingen.									
—	—	30	25	7,2	17,7	24,9			
—	+	60	25	14,7	16,6	31,3	7,5	— 1,1	6,4
+	—	22	18	5,0	13,2	18,2			
+	+	65	24	14,8	16,7	31,5	9,8	3,5	13,3
IV. Gartenkomposterde der Gärtnerei Z., Liebefeld.									
—	—	66	16	13,6	14,2	27,8			
—	+	74	10	14,3	9,6	23,9	0,7	— 4,6	— 3,9

Wir sehen bereits in den Töpfen, die mit Stallmist, aber ohne Jod gedüngt sind, eine starke Vermehrung des Jods bei den ersten beiden Erden, nicht aber bei der dritten Erde. Bei der vierten Erde fehlt in dieser Beziehung das Vergleichsmaterial. Diese Vermehrung bezieht sich hauptsächlich auf die Blätter, in viel geringerem Grade auf die Wurzeln. Ich bin nicht der Ansicht, daß etwa der Jodgehalt des Stallmistes diese Vermehrung bewirkt hat, denn er erhöht das bereits im Boden vorhandene Jod nur ganz unwesentlich. Es dürfte vielmehr durch den Dünger eine Änderung des Bodens in chemisch-biologischer Hinsicht erfolgt sein, auf welche die Pflanze bei den beiden sauren Böden mit einer erhöhten Jodaufnahme reagierte.

Die Joddüngung hat bei der ersten Erde weitaus am stärksten gewirkt, bei der zweiten Erde immer noch beträchtlich, bei der dritten

bedeutend weniger; sie ist hier in einem Falle überhaupt nur bei den Blättern bemerkbar. Die vierte Erde zeigt bei den Blättern überhaupt keinen Effekt, bei den Wurzeln sogar eine kleine Verminderung der Jodaufnahme.

Die Jodmehraufnahme bezieht sich durchweg viel mehr auf die Blätter als auf die Wurzeln.

Wir finden also hier wieder unser bereits an Runkelrüben festgestelltes Resultat bestätigt, daß die Joddüngung wirklich eine Mehraufnahme an Jod durch die Pflanzen bewirken kann. Diese Wirkung ist aber in hohem Grade abhängig von der zum Versuch verwendeten Erde. Die katalytisch wirksameren Böden, welche zugleich die saureren sind, ergeben ein bedeutend höheres Resultat als die katalytisch weniger wirksamen, alkalischen. Daß wirklich die Wasserstoffionenkonzentration in erster Linie hier in Betracht kommen dürfte, geht aus folgendem hervor. Die Gärtnerei Z., von welcher die Gartenkomposterde IV stammt, liegt ganz in der Nähe des Gutes Liebefeld, welches uns die Erde I geliefert hat. Es handelt sich um diluvialen Schotter, welcher jene ganze Gegend gleichmäßig bedeckt. Die Erde IV ist also durch Kompostierung aus I hervorgegangen. Es ist nichts aus der Erde herausgenommen, sondern verschiedenes hineingebracht worden. Daß dadurch die Wirkung, Jod an die Pflanzen abzugeben, so stark verringert worden ist, dürfte wohl nicht mit den zugesetzten Stoffen, sondern lediglich mit der veränderten Wasserstoffionenkonzentration im Zusammenhang stehen.

Wir stehen mit unserem Resultat im Gegensatz zu *M. von Wrangell*, welche eine deutliche Jodmehraufnahme nach der Joddüngung bestreitet. Es ist sehr wohl möglich, daß *v. Wrangell* eine Erde zu ihren Versuchen verwendet hat, welche eine nur geringe Mehraufnahme durch die Pflanzen erlaubte, und daß daher der Effekt innerhalb der Versuchsfehlergrenze lag.

Unsere Resultate geben uns einen gewissen Fingerzeig über den Mechanismus der Jodaufnahme. Wenn aus den katalytisch wirksamsten Erden am meisten Jod aufgenommen wird, so könnte es sein, daß es vor allem elementares Jod ist, welches durch die Pflanzen aufgenommen wird. Bezüglich der Jodaufnahme durch die Blätter habe ich dies bereits früher¹ nachgewiesen.

Gehen wir nun über zur Untersuchung der Erden. Sie erstreckte sich auf wasserlösliches, pottaschelösliches, säurelösliches (in Erdalkalien eingeschlossenes) und aufschließbares (in Silikate eingeschlossenes) Jod, wie dies bereits in anderen Fällen (l. c.) gemacht worden war.

Das in Erdalkalien und in den Silikaten eingeschlossene Jod muß hauptsächlich als Reservejod angesehen werden; für einen kurzfristigen

¹ Diese Zeitschr. 189, 426, 1923.

Kulturversuch dürfte es meines Erachtens nicht sehr in Frage kommen. Größere Bedeutung ist dem wasserlöslichen und dem pottaschelöslichen Jod zuzuschreiben. Ersteres ist wohl hauptsächlich anorganisch gebunden. Letzteres dürfte aus adsorbiertem, anorganischem (Jodion und elementares Jod) und aus organisch gebundenem Jod bestehen. Ich denke speziell an die Möglichkeit einer Bindung an Humussäuren.

Die Bestimmung der verschiedenen Formen Jod geschah folgendermaßen.

Wasserlösliches Jod. 25 g Erde werden mit 250 ccm destilliertem Wasser unter häufigem Umschütteln in einer geschlossenen Stöpselflasche 40 Stunden stehengelassen, filtriert und das Filtrat auf bekannte Weise untersucht.

Pottaschelösliches Jod. 25 g Erde werden in einem gewogenen, 400 ccm fassenden Becherglas mit 2,5 ccm gesättigter Pottaschelösung und 250 ccm Wasser übergossen und $1\frac{1}{4}$ Stunde lang unter zeitweisigem Umrühren unter Eintauchen in siedendes Wasserbad erhitzt. Man ergänzt nach dem Abkühlen das verdunstete Wasser, filtriert und bestimmt in aliquoten Teilen des Filtrats das Jod nach dem Eindampfen und Verbrennen unter Pottaschezusatz. Nach Abzug des wasserlöslichen erhält man das noch in Pottasche lösliche Jod.

Salzsäurelösliches Jod. Die mit Pottasche extrahierte Erde wird vom Filter in das Becherglas zurückgespült und mit Wasser auf 400 ccm verdünnt. Man läßt bis zum nächsten Tage stehen, gießt oder hebert die Flüssigkeit sorgfältig ab und versetzt den zurückbleibenden Brei mit Salzsäure, solange noch ein Aufbrausen stattfindet. Dann spült man ihn in einen Meßzylinder, bringt das Volumen auf 125 oder 150 ccm, filtriert und bestimmt das Jod in einem aliquoten Teile, indem man das Volumen der Erde als 10 ccm annimmt.

Silikatjod. Man schließt mit KOH auf nach früher angegebener Methode.

Die folgende Tabelle enthält die bei den verschiedenen Böden erhaltenen Werte.

Tabelle VI.

Gehalt der Böden an verschieden gebundenem Jod in γ pro Kilogramm.

	I. Erde	II. Erde	III. Erde	IV. Erde
Wasserlösliches Jod (anorganisch)	1	17	17	6
Pottaschelösliches Jod (adsorbiert bzw. organisch)	800	300	300	760
Säurelösliches Jod (in Erdalkalien eingeschlossen)	26	33	95	90
Aufschließbares Jod (in Silikaten eingeschlossen)	590	440	530	610

Die beiden Liebefelder Erden, die ursprüngliche (I) und die Komposterde (IV), enthalten weitaus am meisten pottaschelösliches Jod, während das wasserlösliche Jod in den beiden anderen Erden in größerer Menge vorhanden ist.

Nachdem die Joddüngung am 11. Mai vorgenommen worden war, wurden die nicht in Kultur stehenden Bodenproben am 1. Juni erneut

auf wasserlösliches und pottaschelöslisches Jod untersucht. Am 3. August, dem Tage der Ernte, wurden nochmals Erdproben aus allen mit Jod gedüngten Töpfen, sowie aus den ohne Jod, aber mit Stallmist versehenen entnommen und untersucht.

Die Tabelle VII gibt die Resultate wieder. Sie gibt auch an, wieviel Jod von den Pflanzen aus 1 kg Erde aufgenommen worden ist. Die pro Kilogramm Erde eingebrachte Jodmenge ist aus der Tabelle I übernommen.

Tabelle VII.

Vergleich des zur Verfügung stehenden Jods mit dem von den Pflanzen aufgenommenen Jod.

Z.	Einbringen von			Im April		Am 1. Juni		Am 3. August		Von den Pflanzen aufgenommenes Jod	
	Karotten	Stallmist	Jod	wasserlösl. Jod	pottaschelösl. Jod	wasserlösl. Jod	pottaschelösl. Jod	wasserlösl. Jod	pottaschelösl. Jod	γ pro kg Erde	% des vorhanden
I. Boden vom Liebefeld. Joddüngung = 2360 γ pro kg.											
1	—	—	—	11	800						
2	+	—	—					50	460	6.1	0.75
3	+	—	+					30	1700	26.5	0.83
4	—	—	+			250	3350	150	1200		
5	+	+	—					30	960	8.2	1.03
6	+	+	+					60	2100	29.0	0.92
7	—	+	+			190	3100	70	2000		
II. Boden vom Pâturage du Droits-Malleray. Joddüngung = 2840 γ pro kg.											
1	—	—	—	17	760						
2	+	—	—					12	310	3.3	0.43
3	+	—	+					50	2880	14.1	0.39
4	—	—	+			150	3950	50	2400		
5	+	+	—					40	850	5.8	0.75
6	+	+	+					120	2520	12.9	0.36
7	—	+	+			190	4400	60	2720		
III. Boden von Sägerütti, Münsingen. Joddüngung = 2670 γ pro kg.											
1	—	—	—	17	300						
2	+	—	—					45	220	5.4	1.70
3	+	—	+					30	1520	7.0	0.23
4	—	—	+			230	2400	70	1680		
5	+	+	—					30	720	4.0	1.26
6	+	+	+					20	1600	7.0	0.20
7	—	+	+			240	2650	60	1460		
IV. Gartenkomposterde der Gärtnerei Z., Liebefeld. Joddüngung = 3190 γ pro kg.											
1	—	—	—	6	330						
2	+	—	—					60	420	7.3	2.17
3	+	—	+					12	1760	6.3	0.18
4	—	—	+			70	3000	50	1660		

Am 1. Juni finden wir bei den beiden saureren Böden eine wohl durch irgendwelche Versuchsfehler bedingte Zunahme, in den beiden basischen aber eine gewisse Abnahme an Jod, wie folgende Zusammenstellung zeigt.

	I. Erde	II. Erde	III. Erde	IV. Erde
Direkt nach der Joddüngung	3170	3620	2990	3530
Am 1. Juni (Gefäße ohne Stallmist)	3600	3950	2630	3070

Das Verhältnis des wasserlöslichen zum pottaschelöslichen Jod ist bei den drei ersten Böden ungefähr dasselbe. Überall ist der größte Teil des zugesetzten Jodids wasserunlöslich geworden und löst sich nun erst in Pottaschelösung. Die stärkste Umwandlung ist bei der Komposterde erfolgt. Die Stallmistdüngung hat die Umsetzung über- raschenderweise nicht deutlich beeinflußt.

Am 3. August finden wir in denselben Töpfen 4 und 7 eine weitere Abnahme des wasserlöslichen Jods, nicht aber eine entsprechende Zunahme des pottaschelöslichen. Im Gegenteil hat auch dieses stark abgenommen. Somit ist ein Verlust an Jod überhaupt eingetreten. Man fragte sich, ob es vielleicht in eine organische, aber in Pottasche unlösliche Form übergegangen sei. Dann müßte es nach dem Verbrennen der Erde gefunden werden. Ein diesbezüglicher Versuch verlief indessen negativ. Eine Umwandlung in salzsäurelösliches oder in aufschließbares Jod dürfte auch ganz ausgeschlossen sein. Somit bleibt nur die Annahme übrig, daß das Jod sich in die unterste Schicht der Gefäße, in die Kiesschicht, zurückgezogen hat. Es würde dies beim Feldversuch einem Auswaschen des Jods entsprechen. Leider ist versäumt worden, die Kiesschicht zu untersuchen.

In den nicht mit Jod gedüngten, aber mit Karotten bepflanzten Gefäßen (2) ist gegenüber den im April untersuchten Proben (1) in drei von vier Fällen eine Zunahme an wasserlöslichem Jod eingetreten. Es scheint demnach, daß im Laufe der Vegetationsperiode unlösliches Jod löslich wird, ein Schluß, der allerdings noch weiter bestätigt werden müßte.

Über die Wirkung des Stallmistes geben uns die Versuche 2 und 5 Auskunft. Wir finden bei Gegenwart von Stallmist überall einen Mehrgehalt an Jod. Das Hinunterwandern scheint also durch die adsorbierende Wirkung des Stallmistes etwas gehemmt zu werden.

Die vorletzte Kolonne unserer Tabelle gibt uns das von den Pflanzen pro Kilogramm Erde herausgeholte Jod an. Wir sehen, daß dieses überall nur einen winzigen Bruchteil des ursprünglich vorhandenen Jods ausmacht. Wie hoch sich dieser Betrag in Prozenten des zur Verfügung stehenden Jods beläuft, zeigt die letzte Kolonne. Bei der Berechnung ist das in Erdalkalicarbonaten und in Silikaten eingeschlossene Jod nicht mitgerechnet, da wir ihm, wie erwähnt, eine geringere Bedeutung beilegen, sondern wieder nur die Summe des wasser- und pottaschelöslichen.

Nach den Resultaten der ersten Erde könnte man vermuten, daß das prozentual aufgenommene Jod eine Konstante sei, indem wir bei niedrigem und hohem Angebot denselben Prozentsatz Jod in den Pflanzen finden, bei der gedüngten Erde beidemal etwas mehr, als bei der ungedüngten. Demnach wäre das Massenwirkungsgesetz für die Jodaufnahme maßgebend. Die anderen Erden, besonders III und IV, zeigen uns aber, daß dies nicht zutrifft, indem hier die absolute Jodaufnahme (vorletzte Kolonne) nahezu konstant ist, die prozentuale aber mit steigendem Jodangebot abnimmt. Daß hier bereits ohne Jodgabe eine ähnliche Jodmenge aufgenommen wird, wie bei der Joddüngung, dürfte seinen Grund darin haben, daß wir es hier ungefähr mit dem Minimum an Jod zu tun haben, welches die Pflanze zu ihrem Gedeihen benötigt. Dieses Minimum von etwa 30 γ für 1 kg Blätter und etwa 15 γ für 1 kg Wurzeln scheint die Pflanze auch aus einem Boden, der sein Jod schwer abgibt, ziehen zu können. Eine Aufnahme darüber hinaus erfordert vielleicht schon das Auftreten elementaren Jods, wie es in katalytisch wirksamen Böden gewährleistet wird.

Der Jodgehalt der Schilddrüsen verschiedener Rinderrassen und seine Beziehungen zur Beschaffenheit dieser Drüsen.

Von

Th. von Fellenberg und Dr. (dsg.) Hans Pacher.

(Aus dem Laboratorium des eidgenössischen Gesundheitsamtes, Vorstand Dr. J. Werder, und dem Laboratorium des zootechnischen Instituts der Universität Bern, Vorstand Prof. Dr. U. Duerst.)

(Eingegangen am 8. Juli 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Prof. *Duerst* unternommen und gehört in den Rahmen der Untersuchungen über die Frage, ob sich verschiedene Rinderrassen durch die Beschaffenheit und Funktion ihrer Schilddrüse voneinander unterscheiden.

Außer der Untersuchung der Drüsen vom Gesichtspunkt der Rassenfrage aus hatten wir bei dem uns zur Verfügung stehenden Material eventuelle Zusammenhänge des Jodgehalts mit dem Herkunftsort der Tiere, mit der Follikelgröße der Schilddrüsen und insbesondere mit dem Drüsengewicht aufzudecken. Von besonderem Interesse war auch die Untersuchung des Jodgehalts pro Gramm Frisch- und Trockengewicht bei kleinen, mittelgroßen und großen Drüsen.

Die für die Auswertung unseres Materials notwendige histologische Beurteilung der Drüsen hatte in liebenswürdiger Weise Herr Prof. Dr. *Wegelin*, Vorstand des pathologischen Instituts der medizinischen Fakultät der Universität Bern, übernommen, der unsere Arbeit auch sonst durch wertvolle Ratschläge unterstützte.

Wir nehmen an dieser Stelle Gelegenheit, den beiden genannten Herren für ihre Zuvorkommenheit unseren Dank auszusprechen.

Das Material.

Das Material, welches wir verarbeiteten, umfaßt 80 Rinderschilddrüsen aus vier verschiedenen Ländern und bezieht sich auf eine Reihe von Rassen. Leider brachten es die Umstände mit sich, daß es nicht möglich war, von den einzelnen Rassen gleichviel Material zu sammeln. Sämtliche Drüsen sind im Zeitraum Ende Dezember 1926 bis Anfang März 1927 gesammelt und sind daher als typische Winterschilddrüsen zu bezeichnen.

Die 80 Schilddrüsen verteilen sich nach Herkunft und Rasse folgendermaßen:

Anzahl	Herkunftsart	Rasse
4	England (Liverpool)	Shorthorn
10	" (Cambridge)	"
1	" (Liverpool)	Hereford
2	" (Cambridge)	Red Polled
1	" "	Jersey
24*	Österreich (Salzburg)	Pinzgauer
3	" (Tirol)	Simmentaler
1	" "	Duxer
1	" "	Kreuzung Duxer mit Braunvieh
13*	Schweiz (Kt. Bern)	Simmentaler
4	" (Kt. Zürich)	Braunvieh
4	" (Kt. Wallis)	Eringer
4	Norwegen (Trøndelag, Gegend von Trondhjem)	Landvieh

* Davon eine fötale Drüse.

Für die Erlaubnis zur Entnahme von Schilddrüsen an Schlachttieren sind wir den Herren Tierärzten Direktor *Strohschneider* (Schlachthof Innsbruck), Dr. *Moser* (Schlachthof Bern) und Dr. *Ochsenbein* (Schlachthof Thun) und für die gütige Übersendung von Schilddrüsenmaterial Herrn Dr. *G. Lunde*, Oslo, sowie den Herren Tierärzten *A. Duc* und *C. Déjago*, Sitten, zu Dank verpflichtet. Das Material an englischen Rinderschilddrüsen wurde uns von Herrn Prof. *Duerst* zur Bearbeitung übergeben.

Leider konnten verhältnismäßig nur wenige Drüsen in vollständig frischem Zustande in Arbeit genommen werden, was zwar für die Joduntersuchung belanglos war, nicht aber für die Beurteilung des Frischgewichts und insbesondere nicht für die der histologischen Präparate. In frischem bzw. einwandfreiem Zustande konnten nur einige Berner Drüsen und die in Formol (1:10) fixiert übersandten norwegischen Drüsen in Bearbeitung genommen werden. Die übrigen Drüsen waren meist mehr oder weniger stark eingetrocknet und zum Teil leicht bis schwer kadaverös. Insbesondere gilt letzteres für einen Großteil der englischen Drüsen, die zwar ihren Wassergehalt infolge beinahe hermetischer Verpackung in Blechschachteln in mit Kochsalzlösung getränkter Watte beibehalten hatten, aber gerade deshalb und infolge der langen Reise stark kadaverös waren. Mit Rücksicht auf die exakte Beurteilungsmöglichkeit machten es diese Umstände leider notwendig, einen Teil des auf Jod untersuchten Drüsenmaterials bei der Verwertung vom histologischen Gesichtspunkt aus außer Betracht fallen zu lassen. Im ganzen vermindert sich dadurch das für die histologische Untersuchung verwertete Material um 15 Drüsen, so daß also für diesen Gesichtspunkt nur 63 Schilddrüsen der Verarbeitung zugeführt werden konnten. Die 15 außer Betracht fallenden Drüsen teilen sich folgendermaßen auf: 9 Shorthorn-, 1 Hereford-, 1 tirol. Simmentaler, 2 tirol. Braunvieh- und 1 tirol. Duxervieh-Schilddrüse sowie die Drüse des Fötus einer Pinzgauer Kuh. Nachdem sich aber auch bei den zahlreichen Drüsen, die zwar nicht als eklatant kadaverös, aber andererseits doch unter keinen Umständen als frisch bezeichnet werden konnten, die bekannte Erscheinung der Epitheldesquamation zeigte, wurde zur Kontrolle der Frage, ob diese Desquamation auf postmortalen Veränderungen im kadaverösen Sinne beruht, oder ob dieselbe vielleicht schon das lebenswahre Drüsenbild charakterisiert, im Berner Schlachthof eine Serie von Rinderschilddrüsen von Tieren der Simmentaler Rasse lebenswarm in Formol

fixiert, um Vergleichsschnitte zu erhalten. Es zeigte sich bei diesen Schnitten ebensowenig eine Epitheldesquamation, wie bei den frisch fixierten norwegischen Rinderschilddrüsen, so daß nach *Wegelin* diese bei zahlreichen unserer als nicht frisch zu bezeichnenden Drüsen festgestellte Erscheinung ohne Zweifel auf postmortalen Veränderungen beruht, die offenbar schon nach relativ kurzer Zeit in Erscheinung treten können.

Der Umstand, daß die Untersuchung des Jodgehalts von Schilddrüsen verschiedener Rinderrassen unter Berücksichtigung des Drüsen gewichts den einen der Hauptgesichtspunkte der Arbeit darstellt, weist von vornherein darauf hin, daß bei der Beurteilung des Drüsenmaterials besonders auch die Frage der kropfigen Entartung berücksichtigt wird. Leider konnten beim Großteil unseres Materials zuverlässige Angaben über die Gewichte der Schlachttiere nicht eingeholt werden, so daß wir auf die Aufstellung von Drüsengewichtsquotienten verzichten müssen, obwohl gerade diese für die Beurteilung der Drüsengröße von Wichtigkeit wären. In Ermangelung dieser Zahlen mußten wir daher gezwungenermaßen ein anderes, vom exakten Standpunkt aus betrachtet freilich weniger einwandfreies Kriterium heranziehen, welches wenigstens ungefähre Anhaltspunkte dafür bietet, welche Drüsen zu den kropfig veränderten zählen und welche nicht, nämlich die absoluten Drüsengewichte. Wir kamen auf Grund der gleich unten auseinandergesetzten Überlegung zu dem Schluß, als Grenze zwischen normalen und kropfig vergrößerten Drüsen für weibliche Tiere vorläufig ein absolutes Drüsengewicht von 30 g anzunehmen.

Der Gedankengang bei der Aufstellung der Zahl war folgender. *Müller* (5) gibt an, daß den von ihm ausdrücklich als normal bezeichneten Rinderschilddrüsen der Holländer Rasse ein Durchschnittsgewicht von 13,3 g zukommt, wobei das Minimum bei 10, das Maximum bei 15 g liegt. Um nun ja nicht der Gefahr ausgesetzt zu sein, die Bezeichnung „kropfig vergrößert“ verfrüht anzuwenden, verdoppeln wir nun zur Erstellung des bewußten Grenzwertes die von *Müller* (5) angegebene Maximalzahl von 15 g für normale Drüsen und gelangen somit zu dem Werte von 30 g. Wir betrachten diese Zahl natürlicherweise keineswegs als Norm, da wir uns des willkürlichen Charakters derselben sehr wohl bewußt sind. Wir befinden uns mit unserer Annahme im Prinzip wohl übrigens in Übereinstimmung mit dem Vorgehen von *Woudenberg* (9), welcher gleichfalls von stark vergrößerten, also kropfig entarteten Schilddrüsen erst von der ungefähren Verdoppelung des Normalgewichts an spricht. Er stellt als „normales Gewicht“ der Thyreoidea beim 8 Wochen alten Kalb 15, 15, 20, 25 und 35 g fest, während er die „vergrößerten Schilddrüsen“ 42, 44 und mehr Gramm schwer fand.

Mit Rücksicht darauf, daß die Untersuchungen der Autoren für Schweizer Vieh durchweg auf einen mittleren Drüsengewichtswert

kommen, der um 30 g herum liegt, ist unsere Zahl als obere Grenze des Normalen wahrscheinlich zu hoch gegriffen. Denn gerade mit Rücksicht auf dieses mittlere Drüsengewicht des Schweizer Viehs, das bekanntlich zum Großteil in Gebieten mit Kropfendemie beheimatet ist, wäre es vielleicht richtiger, den Grenzwert bis auf 20 g herabzudrücken. Wir behalten aber unsere Zahl aus genannten Gründen trotzdem bei. Die Richtigkeit des von uns angenommenen Grenzwertes ist übrigens deshalb nicht eine prinzipielle Forderung, weil ja ein Hauptgesichtspunkt der Jodfrage, nämlich der Verfolg der Jodmenge bei steigendem Drüsengewicht, im allgemeinen mit der angenommenen Stellung des Grenzwertes nicht weiter in Beziehung steht.

Eine besondere Erwähnung verdienen die von uns für Stiere der verschiedenen Rassen gefundenen Werte der Drüsengewichte. Unser diesbezügliches Material stammt durchweg von Stieren, die im Alter von 1 bis 2 Jahren geschlachtet wurden. Es waren Tiere von geringer Größe. Die absoluten Drüsengewichtswerte betragen einmal 20,7, einmal 34,2 und bei den übrigen 5 Drüsen 51,9 bis 93,5 g. Nach *Krupski* (4) gilt für diese Altersgruppe bei männlichen Tieren der Schweizer Rassen ein Mittelwert von 23,2 g. Wenn wir, wie früher, in Rücksicht ziehen, daß bei Errechnung dieses Mittelwertes ohnehin schon ein wesentlicher Prozentsatz mit Tieren mit kropfig vergrößerten Schilddrüsen mit einbezogen ist, so ergibt sich die Folgerung, daß mit Ausnahme eines Falles (20,7 g) alle von uns verwerteten Schilddrüsen männlicher Tiere durch kropfige Vergrößerung gekennzeichnet sind. Man könnte vielleicht auch den einen, nicht so typischen Fall wenigstens als kropfverdächtig ansehen, da es sich hierbei doch um eine dem von *Krupski* (4) gefundenen Wert sehr angenäherte Zahl handelt.

Ähnliches wie vom Gewicht der Schilddrüse von Stieren ist wohl auch für die von Ochsen gewonnenen Drüsen zu sagen. Die Tiere standen alle in einem Alter von 2 bis 3 Jahren, mit Ausnahme eines einzigen, welches 4 Jahre alt war. Nach *Studer* (7) sind im präpuberalen Stadium kastrierte männliche Tiere — und um solche handelt es sich bei den von uns berücksichtigten Ochsen verschiedener Rassen — durch verhältnismäßig leichte Schilddrüsen gekennzeichnet. Wir sehen dies an den Drüsengewichten von 2 Shorthornochsen mit 12,6 und 17,3 g bestätigt. Die übrigen 7 Schilddrüsen von Ochsen zeigten jedoch Gewichte, welche wesentlich über diese Zahlen hinausgehen (38,3 bis 72,4 g). Somit kann auch in diesen Fällen ohne Zweifel von einer kropfigen Vergrößerung gesprochen werden.

Bevor wir auf die Besprechung der Methodik eingehen, seien hier einige allgemeine und spezielle histologische Befunde an unserem Material vorangeschickt.

Nach Herrn Prof. *Wegelin* sind die verwerteten Rinderschilddrüsen im allgemeinen als kolloidreich zu bezeichnen, und zwar ist die Konsistenz des Kolloids dünnflüssig zu nennen; es besteht durchweg Eosinophilie. Bei den zahlreichen Fällen von kropfiger Veränderung handelt es sich fast ausschließlich um eine Struma diffusa colloidosa. Nur in vier Fällen liegt Struma diffusa parenchymatosa vor, und zwar handelt es sich hierbei um die Drüsen von Tieren folgender Rassen: Pinzgauer (1), schweizerisches Braunvieh (1), norwegisches Landvieh (2).

Die in Bearbeitung genommene Schilddrüse einer Jersey-Kuh zeigte im histologischen Bild bei starker Zunahme des Bindegewebes eine Sklerose.

Das merkwürdigste Bild boten die soeben erwähnten parenchymatösen Strumen von norwegischem Landvieh (zwei etwa 1jährige Stiere). An beiden Drüsen fallen im mikroskopischen Bild neben den übermäßig hohen zylindrischen Epithelzellen der kleinen, nur spärlich mit dünnflüssigem Kolloid ausgestatteten Bläschen ganz besonders die sonst für Basedow eigentümlichen verzweigten Schläuche auf, die in die Papillen und Polster hineinragen. Daß sich die norwegischen Drüsen auch bezüglich des Jodgehalts recht auffällig verhalten, wird bei den diesbezüglichen Besprechungen erwähnt werden.

Eine Anzahl von Drüsen, 6 Stück, waren mit größeren Cysten von 3 bis 10 mm Durchmesser behaftet. Mit Ausnahme einer Drüse, welche von Cysten ganz durchsetzt war, zeigten sich in den anderen Fällen 2 bis 5 Cysten pro Drüse. Merkwürdig ist, daß sämtliche 6 Fälle nur Schilddrüsen von Tieren der Pinzgauer Rasse betreffen, während sich unter den zahlreichen Drüsen von Tieren anderer Rassen keine mit derartiger Cystenbildung vorfinden, obwohl wir hier wie dort Tiere verschiedener Altersstufen berücksichtigten.

Von den beiden fötalen Drüsen konnte nur die eine (von dem Fötus einer Simmentaler Kuh) histologisch untersucht werden; die andere (von dem Fötus einer Pinzgauer Kuh) war leider vollständig kadaverös. Die untersuchte Drüse zeigt kleine, zum größeren Teil mit wenig, zum geringeren Teil aber mit schönem Kolloid ausgefüllte Follikel.

Methodisches.

Bei der Verarbeitung des Materials hatten wir folgende Arbeitseinteilung eingeschlagen: *v. Fellenberg* übernahm die Fett- und Trockensubstanzbestimmungen, für die er zum Teil eigene, von den bisherigen Methoden abweichende Wege ging, *Pacher* führte die Jodbestimmungen nach der Methodik von *v. Fellenberg* aus und stellte die histologischen Präparate her.

A. Methodik der Fett-, Trockensubstanz- und Jodbestimmung.

Anfänglich nahmen wir bei jeder Drüse eine Trennung des Materials in einen für die Fett- und Trockensubstanzbestimmung einerseits und die Joduntersuchung andererseits bestimmten Teil vor. Die Drüsen wurden

fein zerhackt und von der möglichst gut gemischten Masse je 2 g, unter Umständen auch weniger, für die Bestimmung der Trockensubstanz und des Fettes abgewogen. Der Rest wurde mit alkoholischer Kalilauge verseift und zur Jodbestimmung verwendet. Die Fettbestimmung erfolgte nach dem von dem einen von uns (2) für Wurst vorgeschlagenen Verfahren durch Auflösen in Salzsäure und Extraktion mit Äther.

Es zeigte sich nun bald, daß es in vielen Fällen praktisch nicht möglich ist, von den zerhackten Schilddrüsen wirkliche Durchschnittsmuster zu entnehmen. Das Fett durchzieht die Drüse oft in Strängen, welche sich nicht homogen im zerhackten Material verteilen lassen. Eine ungleiche Probeentnahme für die Fett- und die Trockensubstanzbestimmung kann aber nicht nur diese beiden Werte fälschen, sondern sie kann besonders auch die Berechnung der fettfreien Trockensubstanz so stark beeinflussen, daß ein ganz falsches Bild der Wirklichkeit erhalten wird. Dazu kommt noch, daß beim Zerhacken der Schilddrüsen, auch wenn dies auf einer Glasplatte geschieht, stets etwas Wasser beim Verdunsten verloren geht.

Wir suchten nun alle diese anfänglich auftretenden Übelstände dadurch zu beheben, daß wir das ganze Material in Kalilauge auflösten und in dieser Lösung alle nötigen Bestimmungen, die Bestimmung der Trockensubstanz, des Fettes und des Jods vornahmen.

Diese *Auflösung der Schilddrüsen* geschieht folgendermaßen: Die etwas zerschnittene Drüse wird in einem Erlenmeyerkolben abgewogen. Man setzt für jedes Gramm Material $\frac{3}{8}$ ccm einer jodfreien Kalilauge zu, welche pro Kubikzentimeter $\frac{2}{3}$ g KOH enthält, und erhitzt vorsichtig über freier Flamme, um einen Teil des Wassers zu verdampfen. Wenn die Masse stark zu schäumen beginnt, unterbricht man, läßt die Lösung abkühlen und fügt gut die Hälfte des Volumens an 95%igem Alkohol zu. Nun erhitzt man mit aufgesetztem Birnenkühler auf dem Wasserbad, bis die vollständige Auflösung erfolgt ist. Dies ist nach ungefähr 30 bis 45 Minuten der Fall. Bei fettreichen Drüsen schwimmt nach einiger Zeit Fett an der Oberfläche. Um es in Lösung zu bringen, nimmt man den Kolben von Zeit zu Zeit vom Wasserbad und schüttelt ihn anhaltend durch. Oft muß der Alkoholzusatz noch etwas vermehrt werden. Gleichzeitig mit der Auflösung der Drüse scheidet sich am Boden des Gefäßes ein schmieriger, in Alkohol unlöslicher Körper aus. Er würde auch bei anhaltendem Erhitzen nicht in Lösung gehen, verteilt sich aber leicht in Wasser.

Man kühlt nun den Kolben ab, gießt die Flüssigkeit in einen 100-ccm-Maßkolben über, löst den Rückstand in etwas warmem Wasser und spült nach. Die Flüssigkeit wird auf 100 ccm aufgefüllt und zu den verschiedenen Bestimmungen verwendet.

a) Die Fettbestimmung.

Die Fettbestimmung geschieht folgendermaßen: Die Flüssigkeitsmenge, welche 1 g frischer Schilddrüse entspricht, wird in einem kleinen Scheidetrichter mit Salzsäure angesäuert und mit ungefähr derselben Menge Äther kräftig geschüttelt. Man läßt bis zur völligen Klärung absitzen und läßt die wässrige Flüssigkeit soweit als möglich abfließen. Es bildet sich stets eine kleine, halb feste Zwischenschicht. Nun gießt man die Ätherlösung soweit als möglich in ein gewogenes Erlenmeyerkölbchen, welches einige Bimssteinkörnchen enthält, schüttelt die Zwischenschicht nochmals mit etwas Äther und trennt wieder ab. Am besten erfolgt die Trennung

der Schichten unter Verwendung des Zentrifugierscheidetrichters nach Th. von Fellenberg (3).

Die Ätherlösung wird abdestilliert, der Rückstand getrocknet und gewogen. Die Trocknung erfolgt in einem elektrischen Trockenschrank bei liegender Stellung des Kölbchens während 10 Minuten bei 150°. Die erhaltenen Fettsäuren müssen in Fett umgerechnet werden. Man bestimmte den Umrechnungsfaktor unter Verwendung von Rinderschilddrüsenfett. Es ergaben:

$$\begin{aligned} 0,1004 \text{ g Fett} &= 0,0928 \text{ g Fettsäuren,} \\ 0,1173 \text{ g „} &= 0,1089 \text{ g „} \end{aligned}$$

Die Fettsäuren müssen demnach mit dem Faktor 1,08 multipliziert werden, um sie in Fett umzurechnen. Der Faktor ist etwas höher, als er sich aus den Triglyceriden der höheren Fettsäuren errechnen läßt.

Zu erwähnen bleibt, daß sich die für die einzelnen Schilddrüsen gefundenen Fettwerte auf sorgfältig auspräparierte Drüsen beziehen. Die Menge des bekanntlich die Schilddrüse umschließenden Fettes muß in den einzelnen Fällen als sehr verschieden bezeichnet werden. Weniger scheint dies für die noch nach der Auspräparation in der Drüse verbleibende Fettmenge zu gelten. Hier fanden wir im großen und ganzen nicht stark schwankende Werte im Vergleich zu den schwankenden Werten der äußeren Fetthüllen. Bei einigen wenigen Drüsen, die in nur grob auspräpariertem Zustande in Bearbeitung genommen wurden (Braunvieh 29, 43, 63, 74 und Red Polled 51 und 54) und welche daher im Vergleich zu den übrigen einen viel zu hohen Fettgehalt aufgewiesen hätten, rechneten wir die Zahlen auf einen mittleren Fettgehalt von 8% um und subtrahierten den Mehrgehalt an Fett vom effektiv gewogenen Gesamtgewicht. Der Wert von 8% entspricht dem mittleren Fettgehalt der von uns im auspräparierten Zustande untersuchten Drüsen.

b) Trockensubstanzbestimmung.

Als Grundlage für unsere Trockensubstanzbestimmung diene die Mikrofettbestimmung nach Bang (1). Sie beruht darauf, daß eine kleine Menge verseiftes Fett mit einem bestimmten Überschuß an Kaliumbichromat unter Zusatz von viel konzentrierter Schwefelsäure verbrannt wird. Der Überschuß der Chromsäure wird auf jodometrischem Wege zurücktitriert.

Im Prinzip lassen sich alle verbrennbaren organischen Substanzen auf diese Weise bestimmen, vorausgesetzt, daß die Natur der Substanz und ihre Reduktionswirkung gegenüber der Chromsäure bekannt ist. In der folgenden Publikation wird der eine von uns zeigen, in welcher Weise die Verbrennung bei manchen Substanzen vor sich geht.

Für die fettfreie Schilddrüsensubstanz, d. h. für das Schilddrüsen-eiweiß, haben wir den Chromsäureverbrauch empirisch festgestellt. Da er von demjenigen des Fettes stark abweicht, geht es nicht an, daraus ohne weiteres den Trockensubstanzgehalt zu berechnen. Man muß zuvor aus dem Fettgehalt berechnen, wieviel Chromsäure vom Fett verbraucht

worden ist, und diesen Wert von dem Gesamtchromsäureverbrauch abziehen. Die Differenz wird dann in fettfreie Trockensubstanz umgerechnet.

Nach Bang würde 1 mg Fett des menschlichen Blutes 2,45 cem n/10 Bichromat entsprechen. Wir fanden für Rinderschilddrüsenfett einen etwas höheren Wert. Fünf Bestimmungen ergaben 2,54 bis 2,59, im Durchschnitt 2,57 cem n/10. Wir haben diese Zahl unseren Berechnungen zugrunde gelegt.

Um den Chromsäureverbrauch von fettfreier Schilddrüsentrockensubstanz zu berechnen, wurde in einigen Schilddrüsen Trockensubstanz und Fett nach dem weiter oben genannten direkten Verfahren bestimmt und daraus die fettfreie Trockensubstanz berechnet. Dann bestimmte man das Fett und den Chromsäureverbrauch in den verseiften Drüsen und berechnete daraus den auf die fettfreie Trockensubstanz entfallenden Chromsäureverbrauch. Wir führen die Werte nur für eine Drüse an. Die übrigen gaben ähnliche Zahlen. Man fand:

Trockensubstanz, direkt bestimmt	24,16 %	23,44 %
Fett in derselben Probe	3,26 %	2,52 %
Fettfreie Trockensubstanz.	20,90 %	20,92 %

Die Werte für die fettfreie Trockensubstanz stimmen gut überein, diejenigen für das Fett aber ungenügend, da es offenbar nicht gelungen war, ganz gleichmäßige Durchschnittsproben zu gewinnen. Man wiederholte daher die Fettbestimmung und fand 3,33 und 3,26 %. Somit ist der Wert von 2,52 % zu niedrig. Der Durchschnitt der drei höheren Werte gibt 3,28 %.

Die Fettbestimmung in der verseiften Drüse ergab in guter Übereinstimmung damit 3,23 %. Für 10 mg Drüse macht das 0,323 mg Fett aus, entsprechend 0,88 n/10 Kaliumbichromat.

Die Bichromatoxydation ergab für je 10 mg frischer Schilddrüse 2,75 und 2,70 cem. Wenn wir davon die 0,88 cem von dem Fett verbrauchte Chromsäure abziehen, bleiben für 2,09 mg fettfreier Trockensubstanz 1,87 und 1,82 cem n/10 $K_2Cr_2O_7$, oder für 1 mg fettfreier Trockensubstanz durchschnittlich 1,13 cem n/10 $K_2Cr_2O_7$. Es entspricht somit 1 cem n/10 $K_2Cr_2O_7$ = 0,89 mg fettfreier Schilddrüsensubstanz.

Praktisch derselbe Wert wurde mit Eiereiweiß erhalten. 1 mg verbrauchte 1,12 cem n/10 Bichromat, somit entspricht 1 cem n/10 $K_2Cr_2O_7$ = 0,90 mg Eiweiß.

Die Bichromatoxydation geschieht wie folgt. Mit einer in tausendstel Kubikzentimeter eingeteilten Mikropipette wird so viel von der Schilddrüsenlösung abgemessen, wie 0,01 g frischer Substanz bei fettreichen Drüsen oder 0,02 g bei fettarmen Drüsen entspricht. Man bringt die Lösung in einen 50-cem-Erlenmeyerkolben, den man vorher mit Brunnenwasser gut ausspült, um eventuell vorhandenen Staub zu entfernen.

Die Schilddrüsenlösung ist unter Verwendung von alkoholischer Kalilauge hergestellt worden. Der Alkohol muß restlos entfernt werden, da er sonst Chromsäure verbrauchen würde. Man erhitzt dazu die abgemessene Lösung sorgfältig über freier Flamme, bis sie gerade trocken ist. Bei einiger Sorgfalt läßt sich dieser Punkt mit Leichtigkeit erreichen, ohne daß die Lösung überschäumt oder anbrennt. Nun setzt man 10 cem n/10 Bichromatlösung hinzu und gießt aus einem Meßzylinder sorgfältig unter Umschwenken 20 cem konzentrierter Schwefelsäure hinein. Die Flüssigkeit färbt sich je nach der Menge der oxydablen Substanz olivengrün bis rein grün. Ist

letzteres der Fall, so genügt die Bichromatmenge nicht. Man setzt entweder noch einige Kubikzentimeter und die doppelte Menge Schwefelsäure zu oder wiederholt den Versuch mit weniger Substanz.

Die Verbrennung ist nach $\frac{1}{4}$ Stunde beendigt. Man kann aber auch nach Belieben länger stehenlassen. Zur Titration gießt man die Lösung in einen 400-ccm-Kolben, spült mit Wasser nach und verdünnt auf etwa 300 bis 350 ccm. Man kann dazu Brunnenwasser verwenden, muß aber dafür Sorge tragen, daß der Wasserstrahl der Wandung nach einfließt, damit nicht unnötigerweise Luftblasen entstehen. Man läßt nun einige Minuten stehen, bis keine Luftblasen mehr sichtbar sind, und setzt einige Zehntel Gramm Kaliumjodid hinzu, wobei durch die überschüssige Chromsäure die äquivalente Menge Jod in Freiheit gesetzt wird. Nach etwa 2 Minuten wird mit $n/10$ Natriumthiosulfatlösung unter tropfenweisem Zusatz zurücktitriert. Den Stärkeindikator fügt man am zweckmäßigsten erst gegen Schluß der Titration zu. Ergibt die Rücktitration weniger als 2 bis 3 ccm, so war der Chromsäureüberschuß ungenügend.

Die Titerstellung erfolgt durch Ausführung eines blinden Versuchs mit derselben Menge Bichromatlösung und Schwefelsäure unter den gleichen Bedingungen.

Die Berechnung geht aus dem oben Gesagten hervor. Man berechnet den Bichromatverbrauch des Fettes, wobei $1 \text{ mg Fett} = 2,57 \text{ ccm } n/10$, und zieht ihn vom Gesamtbichromatverbrauch ab. Die Differenz mit 0,89 multipliziert, gibt an, wieviel Milligramm fettfreier Trockensubstanz in der angewandten Flüssigkeitsmenge vorhanden sind. Durch Addition der fettfreien Trockensubstanz und des Fettes resultiert die Trockensubstanz.

Unsere Methode kann nicht als sehr genau bezeichnet werden. Es hätte keinen Zweck, die Werte mit zwei Dezimalen anzugeben, da bereits die erste Dezimale unsicher ist. Die Methode ist aber für unsere Zwecke genügend genau und jedenfalls der getrennten Bestimmung in verschiedenen nacheinander entnommenen Materialproben vorzuziehen, weil dort infolge der Schwierigkeiten der Probeentnahme gelegentlich Fehler von mehreren Prozentsen vorkommen können, wovon wir uns mehrfach überzeugt haben.

Bei der Verarbeitung und Zusammenstellung des von uns gewonnenen Zahlenmaterials ergab sich die Frage, ob es zweckmäßig sei, die Frischgewichte der Schilddrüsen als Kriterium der Zusammenstellung zu wählen oder aber die Trocken- bzw. fettfreien Trockengewichte. Obwohl die letztere Größe prinzipiell vorzuziehen wäre, haben wir uns doch für die Frischgewichte entschieden; denn diese Gewichte bieten den Vorteil, daß sie direkt mit den von anderen Autoren gefundenen vergleichbar sind. Zudem ist, wie wir bereits weiter oben erwähnt haben, der Fettgehalt von gut auspräparierten Drüsen in den einzelnen Fällen so ziemlich konstant, so daß, wie wir später sehen werden, die Gewichtskurven der Trockensubstanz und der Frischgewichte der Drüsen praktisch gleichmäßig verlaufen.

Wie eingangs der Arbeit erwähnt wurde, mußte ein großer Teil des Drüsenmaterials in mehr oder weniger stark eingetrocknetem Zustande

in Arbeit genommen werden. Wir mußten daher für diese Drüsen die Werte des Frischgewichtes berechnen, und zwar schlugen wir folgenden Weg ein: Wir konnten an unserem Material im ganzen 16 Drüsen als frisch bezeichnen. Wir errechneten nun den mittleren Gehalt dieser Drüsen an fettfreier Trockensubstanz und fanden einen Prozentwert von 16,6. Wir rechneten nun die effektiv ermittelten Gewichte der in verschieden starkem Maße eingetrockneten Drüsen auf fettfreie Drüse von 16,6 % Trockensubstanzgehalt um und erhielten daraus durch Addition des Fettes das Frischgewicht.

c) Jodbestimmung.

Die Jodbestimmung geschieht wie folgt. Man führt gleich mehrere Einzelbestimmungen nebeneinander aus. Für jede Probe wird so viel von der Lösung, wie 0,1 g frischer Substanz bei jodreichen Drüsen oder die doppelte Menge bei jodarmen Drüsen entspricht, in eine flache Eisenschale von 10 cm Durchmesser gebracht und mit 6 Tropfen gesättigter Pottaschelösung versetzt. Man dampft über freier Flamme ein, erhitzt weiter über einem Pilzbrenner, zuerst schwächer, dann bis auf etwa 400° (Temperatur des schmelzenden Zinks). Nach einigen Minuten, wenn jeder Geruch verschwunden ist, kühlt man ab, verreibt den Rückstand mit etwas Wasser, um die Kohle gut zu verteilen, und setzt 4 bis 6 Tropfen 10 %ige NaNO_3 -Lösung zu. Man trocknet wieder und erhitzt in gleicher Weise wie vorhin, zum Schluß noch einen Augenblick stärker mit einem Teklubrenner. Nun befeuchtet man den Rückstand wieder mit Wasser, wobei keine Kohle mehr sichtbar sein soll, und dampft vorsichtig nahezu zur Trockne ab. Der Rückstand soll noch eben feucht sein. Nach dem Abkühlen extrahiert man einmal mit 85 %igem und zweimal mit 95 %igem Alkohol unter Verreiben mit einem Pistill.

Die Alkohollösung wird in einer Platin- oder Goldschale unter Zusatz derselben Menge Wasser, eines Tropfens Phenolphthalein und einiger Tropfen Pottaschelösung eingedampft, der Rückstand vorsichtig gegläht, so daß die Farbe des Phenolphthaleins gerade verschwindet, und wieder mit Alkohol extrahiert. Man dampft nach dem Verdünnen mit Wasser wieder ein, glüht äußerst vorsichtig und spült den Rückstand unter vier Malen mit je einigen Kubikzentimetern Wasser in ein 50 ccm fassendes Erlenmeyerkölbchen. Man setzt nun einen Tropfen dreifach normaler Schwefelsäure zu und so viel frisches Chlorwasser, daß ein beigesetzter Tropfen Methylorangelösung sofort (nicht erst nach einigen Sekunden) entfärbt wird. Nach Versetzen mit etwas Bimssteingranula dampft man auf ein kleines Volumen ein, kühlt ab, setzt ein Körnchen Kaliumjodid zu und trituriert mit n/250 Thiosulfatlösung. Die Titerstellung wird durch analoge Behandlung von etwas Kaliumjodidlösung bekannten Gehalts ausgeführt.

Bei Schilddrüsen mit abnorm niedrigem Jodgehalt empfiehlt sich die kolorimetrische Bestimmung.

B. Die histologischen Präparate.

Die Herstellung der für die histologische Beurteilung nötigen Drüsen-schnitte erfolgte mit dem Gefriermikrotom. Gefärbt wurden dieselben in üblicher Weise mit Haemalaun-Eosin.

Die Untersuchungsergebnisse.

A. Beziehungen zwischen Jodgehalt und histologischem Bild einerseits und Drüsengröße andererseits.

Unsere Haupttabelle (Tabelle I) bringt unsere Untersuchungsergebnisse nach steigendem Schilddrüsenfrischgewicht geordnet. Die graphische Darstellung Nr. 1 gibt die hauptsächlichsten Werte als Kurven wieder.

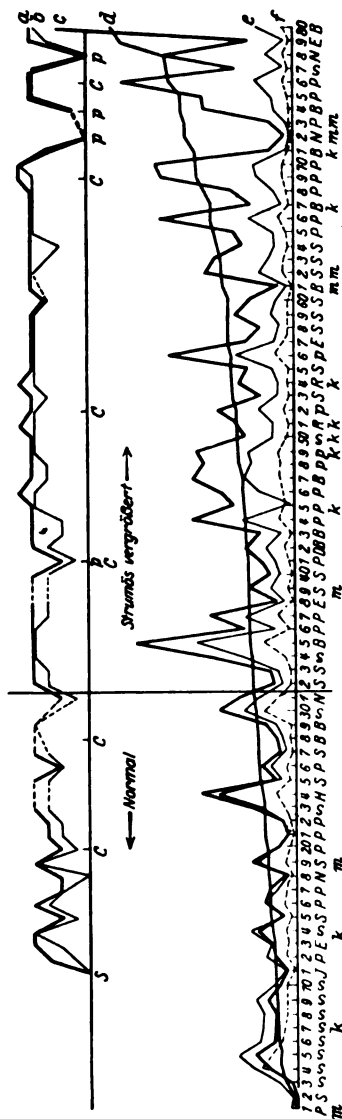


Abb. 1.

Bezeichnung der Kurven: a = Kolloid.

b = Follikel.

Bezeichnungen auf der oberen Horizontalen:

Bezeichnungen auf der unteren Horizontalen:

Rasse: S = Simmentaler.

B = Braunvieh.

P = Pinzgauer.

B = Eritger.

Geschlecht: m = männlich.

k = kastriert.

c = Gesamtjod.

d = Frischdrüsen-gewicht.

p = Str. diff. parenchymatosa.

D = Duxer.

ø = Shorthorn.

R = Red Follied.

k = kastriert.

e = Jod pro g frischer Drüse.

f = Jod pro g Trockensubstanz.

S = Sklerose.

J = Jersey.

H = Hereford.

N = Norwegisches Landvieh.

C = Cysten.

Tabelle I. Chemische und histologische Resultate aller untersuchten

Nr.	Geschlecht	Rasse	Herkunft	Alter	Gewicht des Tieres kg	Gewicht in g			
						Frische Drüse	Fett	Fettfreie Drüse	Fettfreie Fettstoffe
1	♀	Pinzgauer	Salzburg	Fötus		0,160	0,005	0,155	0,00
2	♀	Simmentaler	Kt. Bern	"		1,74	0,075	1,66	0,00
3	♀	Shorthorn	Liverpool	3 "		8,7	1,43	7,3	1,71
4	♀	" Kreuzung	"	2 $\frac{1}{2}$		10,4	2,15	8,2	0,88
5	♀	"	"	1 $\frac{3}{4}$		11,2	2,76	8,4	1,71
6	♀	"	"	alt		12,5	2,06	10,4	1,55
7	♀	"	"	3		12,6	1,58	11,0	1,60
8	♀	"	"	3 $\frac{1}{2}$		13,3	1,30	12,0	2,00
9	♀	"	"	3		14,1	1,75	12,3	3,11
10	♀	"	"	2 $\frac{1}{2}$		14,6	1,64	13,0	1,95
11	♀	Jersey	"	7		15,0	1,59	13,4	3,20
12	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		15,1	1,73	13,4	2,45
13	♀	Eringer	Kt. Wallis	2 $\frac{1}{2}$		15,4	1,68	13,7	3,25
14	♀	Shorthorn,	Cambridge	2 $\frac{1}{4}$	407	17,3	2,62	14,7	4,28
15	♀	Simmentaler	Kt. Freiburg	2	370	18,4	2,79	15,6	4,06
16	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		19,3	2,26	17,0	3,02
17	♀	"	"	—		19,5	0,92	17,6	2,99
18	♀	Norweg. Landvieh	Tründelag	15—16	367	20,0	3,10	16,9	2,44
19	♀	Simmentaler	Tirol	—		20,7	0,73	20,0	4,40
20	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		20,7	1,48	19,2	3,23
21	♀	"	"	—		22,2	1,16	21,0	3,51
22	♀	"	"	—		22,4	0,77	21,6	3,61
23	♀	Shorthorn	Cambridge	2 $\frac{1}{4}$	450	22,6	3,40	19,2	3,88
24	♀	Hereford	Liverpool	1 $\frac{1}{2}$		23,8	5,42	18,4	4,75
25	♀	Simmentaler	Kt. Bern	4—5	500	26,5	3,03	23,5	3,66
26	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		27,2	1,50	25,7	4,30
27	♀	Simmentaler	Kt. Bern	2	410	28,0	2,61	25,4	6,10
28	♀	Braunvieh	Tirol	—		28,0	1,22	26,8	4,50
29	♀	"	Kt. Zürich	14	300	29,0	2,50	26,5	6,54
30	♀	Shorthorn	Liverpool	—		29,7	4,15	25,5	2,48
31	♀	Norweg. Landvieh	Tründelag	10	402	30,0	6,16	23,8	3,75
32	♀	Simmentaler	Kt. Bern	2 $\frac{1}{2}$	520	30,3	4,42	25,9	4,60
33	♀	"	"	9—10	550	31,0	3,15	26,8	5,82
34	♀	Shorthorn	Cambridge	2	676	31,6	9,86	21,7	7,50
35	♀	Braunvieh	Tirol	—	450	32,8	2,20	30,6	5,10
36	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		32,9	2,24	30,7	9,05
37	♀	"	"	—		33,3	1,37	31,9	5,3
38	♀	Eringer	Kt. Wallis	2 $\frac{1}{2}$		34,0	3,07	30,9	6,45
39	♀	Simmentaler	Tirol	—		34,2	0,57	33,6	5,39
40	♀	"	Kt. Freiburg	6	680	34,4	2,95	31,4	5,57
41	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		34,5	2,40	33,1	5,39
42	♀	Duxer/Graubraun	Tirol	—		36,3	1,44	34,9	5,63
43	♀	Braunvieh	Kt. Zürich	5	300	36,4	3,8	32,6	8,88
44	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		36,9	1,13	35,8	5,98
45	♀	Braunvieh	Tirol	—		38,3	2,33	36,0	6,00

* Die Mehrzahl hat wenig Kolloid, die Minderzahl aber schönes Kolloid.

Schilddrüsen nach steigendem Frischdrüsengewicht geordnet,

Nr.	mg Jod in			Kolloid	Follikel	Eventuelle strumöse Veränderungen
	1 g frischer Drüse	1 g getrockneter Drüse	der ganzen Drüse			
0063	0,071	0,011				
0082	0,75	0,056		unregelmäßig	klein klein, aber gut m. Kolloid gefüllt *	
013	0,66	1,13				
042	5,11	4,32				
053	3,49	5,95				
067	2,14	3,33				
074	1,86	3,03				
083	1,50	3,06				
090	1,33	4,22				
097	1,28	2,49				
099	0,42	1,35		spärlich	klein	Starke Zunahme des Bindegewebes, Art Sklerosa
022	1,31	3,25		ziemlich viel	klein bis mittel	
047	1,09	3,57		viel	mittelgroß	
033	1,34	5,72		"	groß	
011	0,50	2,02		mäßig	klein bis mittelgroß	
025	1,51	4,55		viel	mittelgroß bis groß	
014	1,36	4,00		mäßig viel	mittelgroß	
061	0,50	1,22		mäßig	klein	
029	1,41	6,16		viel	groß	
044	0,87	2,80		mäßig	klein bis mittelgroß mit einzelnen kl. Cysten	
050	0,31	1,09		ziemlich viel	mittelgroß	
063	0,57	2,07				
028	1,63	6,61		viel "	mittelgroß bis groß	
058	2,88	13,8				
010	0,72	2,65		"		
019	1,20	5,18		mäßig viel	mittelgroß " "	
008	0,37	2,25		viel	mittelgroß bis groß	
010	0,62	2,80				Mit Cysten
014	0,67	4,35		"	groß	
037	4,46	11,1				
028	2,24	8,40		mäßig	klein bis mittel	
010	0,66	3,03		viel	mittelgroß bis groß	Str. diff. coll.
012	0,64	3,73		"	" " "	" " "
040	1,68	12,6		"	groß " " "	" " "
071	4,58	23,3		"	"	" " "
015	0,86	7,88		"	"	" " "
013	2,38	12,6		"	mittel bis groß	" " "
007	0,42	2,69		"	mittelgroß bis groß	" " "
019	1,11	6,50				
011	0,68	3,78		"		Str. diff. coll.
016	0,98	5,25		mäßig	klein " bis " mittel " mit Cysten	Str. diff. parenchym.
012	1,34	7,55		viel	mittelgroß bis groß	" " coll.
010	0,54	4,80		"	mittelgroß	" " "
017	2,24	15,4		"	"	" " "
023	1,48	8,85		"	groß "	" " "

Nr.	Geschlecht	Rasse	Herkunft	Alter	Gewicht des Tieres kg	Gewicht in g			
						Frische Drüse	Fett	Fettfreie Drüse	Fettfreie Drüse
46	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		38,5	1,84	36,7	6,12
47	♀	Braunvieh	Tirol	1½		38,7	1,74	37,0	6,18
48	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		40,2	1,67	38,5	6,48
49	k.	"	"	—		40,6	1,31	39,3	6,58
50	k.	Shorthorn	Cambridge	2	543	41,0	11,39	29,6	6,70
51	k.	Red Polled	"	4	575	41,8	4,26	37,5	11,70
52	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		42,6	0,99	41,7	6,98
53	♀	Simmentaler	Kt. Bern	10	520	45,2	2,68	42,5	8,70
54	k.	Red Polled	Cambridge	2	520	45,9	5,05	40,8	9,10
55	♀	Simmentaler	Kt. Freiburg	10	550	46,0	5,81	40,2	8,20
56	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		46,1	0,31	45,2	7,54
57	♀	Eringier	Kt. Wallis	4		48,0	4,95	43,0	7,58
58	♀	Simmentaler	Kt. Bern	8	630	48,5	1,87	46,6	11,58
59	♀	"	"	13—14	700	48,6	3,46	45,1	9,80
60	♀	"	Kt. Freiburg	6	600	49,4	3,73	45,7	9,00
61	♂	Braunvieh	Tirol	1½		51,5	1,62	49,9	8,10
62	♂	Simmentaler	"	—		51,9	1,66	50,2	8,4
63	♀	Braunvieh	Kt. Zürich	9	304	53,5	5,0	48,5	8,20
64	♀	Simmentaler	Kt. Bern	6	720	55,2	2,17	53,0	10,80
65	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		59,4	1,16	58,2	9,51
66	♀	"	"	2½—3		60,2	2,59	57,6	9,68
67	k.	Braunvieh	Tirol	2		61,0	1,48	59,5	9,90
68	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		64,6	0,25	64,3	10,68
69	♀	"	"	—		70,1	2,11	69,0	11,4
75	♀	"	"	—		70,8	1,64	69,2	11,6
71	k.	Braunvieh	Tirol	—		72,4	3,43	69,0	11,46
72	♂	Norweg. Landvieh	Tröndelag	1	291	79,0	4,51	74,5	14,0
73	♂	Duxer	Tirol	1	420	79,0	1,78	77,8	14,82
74	♀	Braunvieh	Kt. Zürich	3½	306	81,5	6,0	75,5	23,3
75	♀	Pinzgauer	Salzburg	—		81,6	2,62	79,0	13,3
76	♀	"	"	—		90,9	0,89	90,0	15,20
77	♀	Shorthorn	Cambridge	2½	475	91,5	12,36	79,1	13,2
78	♂	Norweg. Landvieh	Tröndelag	1	196	93,5	6,09	87,4	13,80
79	♀	Eringier	Kt. Wallis	5		126,3	8,42	119,9	19,7
80	♀	Braunvieh	Tirol	alt		130,4	1,64	128,8	21,5

* Merkwürdig sind die relativ kleinen Bläschen bei dem hohen Gewicht und dem niedrigen Jodgehalt.

** Merkwürdigerweise finden sich hier, wie bei Basedow, verzweigte Schläuche, in welche Papillen

Fortsetzung).

Nr.	mg Jod in			Kolloid	Follikel	Eventuelle strumöse Veränderungen
	1 g getrockneter Schilddrüse	der ganzen Drüse				
28	1,78	10,9	sehr viel	groß		Str. diff. coll.
29	2,25	15,1	viel	mittelgroß bis groß		" " "
34	2,12	13,7	"	" " "		" " "
36	2,20	14,4	"	groß		" " "
38	1,10	7,40	"	"		" " "
46	0,73	8,50	sehr viel	"		" " "
56	1,60	11,1	viel	groß, mit einzelnen Cysten		" " "
11	0,57	4,97	"	mittelgroß bis groß		" " "
13	0,90	8,20	sehr viel	groß		" " "
15	0,84	6,90	viel	"		" " "
22	2,46	18,56	"	"		" " "
45	0,96	7,20	"	"		" " "
11	0,46	5,33	"	"		" " "
18	0,89	8,75	"	"		" " "
14	0,41	6,90	ziemlich viel	mittelgroß bis groß		" " "
45	0,28	2,31	viel, dünnflüss.	—		Str. diff. coll. fraglich, weil stark kadaverös
26	1,61	13,2	viel	groß		Str. diff. coll.
19	1,42	11,8	"	mittelgroß bis groß		" " "
14	0,75	7,75	"	mittelgroß		" " "
15	1,00	9,05	"	groß		" " "
33	2,05	19,8	"	"		" " "
10	0,62	6,10	"	"		" " "
15	0,88	9,40	"	"		" " "
28	1,72	19,6	sehr viel	groß, mit Cysten		" " "
29	1,74	20,1	"	sehr groß		" " "
0,51	0,32	3,70	relativ viel	mittelgroß bis groß		" " "
0,20	0,12	1,58	spärli. (dünnfl.)	klein		Str. diff. parenchym. **
0,88	0,23	3,43				
15	0,57	13,4	wenig bis mäß.	klein bis mittelgroß		" " "
17	1,02	13,6	viel (mehr stellenweise)	groß		Str. diff. coll.
28	1,67	25,12	viel	groß m. kleinen Cysten		" " "
09	0,63	8,23	"	groß		" " "
20	1,36	18,8	spärli. (dünnfl.)	klein		Str. diff. parenchym. **
0,52	0,33	6,55	viel	mittelgroß bis groß		Str. diff. coll.
27	1,61	34,5	"	groß (bis 600 mik.)		" " "

Drüse.
Polster hineinragen.

Wir geben die Gewichte für Fett und fettfreie Drüse nicht in Prozenten, wie üblich, sondern in Grammen, auf die ganze Drüse bezogen, an. Die Jodgehalte sind in Milligrammen pro Gramm frischer Drüse, pro Gramm fettfreier Drüse und pro ganze Drüse berechnet.

Übersichtlicher als die Tabelle gibt unsere Kurventafel die Beziehungen zwischen den einzelnen Zahlen wieder. Die Maßstäbe der einzelnen Kurven sind beliebig gewählt; für Milligramm J pro Gramm frischer Drüse haben wir einen fünffach größeren Maßstab angewendet als für Milligramm J pro Gramm Trockendrüse und pro ganze Drüse. Kolloid und Follikel wurden in sechs Stufen nach folgendem Schema dargestellt.

Stufe	Kolloid	Follikel
6	Sehr viel	Sehr groß
5	Viel	groß
4	Ziemlich viel (relativ viel)	Mittelgroß bis groß
3	Mäßig	Mittelgroß
2	Wenig bis mäßig	Klein bis Mittel
1	Spärlich	Klein

Bei der Besprechung der Tabelle bzw. Kurventafel wollen wir von vornherein von den beiden leichtesten Drüsen, den fötalen Schilddrüsen, absehen, da diese sich nicht mit den übrigen Drüsen vergleichen lassen.

Die Grenze der strumösen Vergrößerung haben wir, wie erwähnt, bei einem Gewicht von 30 g festgesetzt. Demnach sind zwei Fünftel der von uns untersuchten Schilddrüsen normal. Drei Fünftel sind Strumen (siehe Trennungsstrich auf der Kurventafel). Von den vier parenchymatösen Drüsen (mit „p“ bezeichnet) hat eine ein mittleres Gewicht (Pinzgauer Nr. 41), drei dagegen gehören zu den schwersten Drüsen, darunter die der beiden einjährigen norwegischen Stiere Nr. 72 und 78, ferner eine Braunviehdrüse (Nr. 74). Die fünf Schilddrüsen mit Cysten der Pinzgauer Rasse (mit „C“ bezeichnet) verteilen sich auf alle Gewichte.

In vier Fällen haben wir den Inhalt einzelner Cysten ausgepreßt und auf Jod untersucht. Folgende Zahlen geben das Verhältnis des Jodgehalts der Gesamtschilddrüsen zum Jodgehalt der Cysten, beides pro Gramm fettfreie Trockensubstanz.

Nr.	Schilddrüse mg J pro g	Cyste mg J pro g
41	0,98	2,34
52	1,60	3,35
69	1,72	1,51
76	1,67	1,76

In zwei Fällen ist der Inhalt der Cysten mehr als doppelt so jodreich wie der Durchschnitt der Schilddrüse, in den beiden anderen Fällen ist er ungefähr gleich.

Zuerst wollen wir nach den allgemeinen Beziehungen zwischen *Drüsengewicht und Jodgehalt* suchen, wie sie aus unseren Kurven ersichtlich sind, ohne uns jedoch viel auf Einzelheiten einzulassen. Später, bei Berücksichtigung der Herkunft und der Rasse werden wir genauer spezifizieren.

Der Jodgehalt pro Gramm frischer Drüse schwankt mit steigendem Drüsengewicht unregelmäßig auf und ab. Bei den leichtesten Drüsen finden wir zwar einige der höchsten Jodgehalte; aber auch später treten sporadisch ähnliche Werte auf. Andererseits finden sich niedrige Jodgehalte nicht nur bei den schwersten, sondern auch bei mittleren, ja selbst bei leichten Drüsen. Wenn wir von allen Schwankungen absehen, so verläuft die Kurve im großen und ganzen ungefähr eben, d. h. bei den leichten, mittleren und schweren Drüsen kommen ungefähr ähnliche Jodgehalte pro Gramm frischer Drüse vor. Später, bei Betrachtung der einzelnen Rassen, wird sich teilweise ein etwas anderes Resultat ergeben.

Ganz ähnlich verhält es sich mit dem Jodgehalt pro Gramm fettfreier Trockendrüse. Auch hier schwankt die Kurve unregelmäßig auf und ab, ohne mit steigendem Drüsengewicht eine deutliche Neigung zum Steigen oder Fallen zu bekunden. Die beiden Kurven folgen sich mit ziemlicher Präzision, ein Beweis für die weiter oben erwähnte relativ geringe Schwankung des Fettgehaltes in gut auspräparierten Drüsen. Es ist somit auch der Jodgehalt pro Gramm fettfreier Trockendrüse nicht proportional dem Frischgewicht der Drüsen.

Der Gesamtjodgehalt macht die Schwankungen der beiden besprochenen Kurven ebenfalls mit. Er erfährt aber im allgemeinen mit steigendem Drüsengewicht eine Zunahme. Am Anfang bewegt sich die Kurve (bei den willkürlich angenommenen Maßstäben) unterhalb derjenigen des Jods pro Gramm frischer Schilddrüse. Später deckt sie sich eine Zeitlang mit jener Kurve, um sich dann dauernd darüber zu erheben. Die Kurve muß übrigens einerseits der Frischdrüsenjodkurve, andererseits der Frischgewichtskurve folgen, denn das Gesamtjod ist ja ein Produkt aus den beiden anderen Werten. Wir können also sagen, daß der Gesamtjodgehalt mit steigendem Drüsengewicht im allgemeinen zunimmt.

B. Beziehungen zwischen Jodgehalt einerseits und Kolloidgehalt und Follikelgröße andererseits.

Die Kurven des Kolloidgehalts und der Follikelgröße folgen sich selbstverständlich gut, zum Teil decken sie sich geradezu (in der gra-

phischen Darstellung dicht nebeneinander gezeichnet). Mit steigender Follikelgröße muß ja der Kolloidgehalt zunehmen und umgekehrt.

Engere Beziehungen dieser beiden Größen zum Drüsenfrischgewicht lassen sich nicht erkennen. Wir haben unter den leichtesten und unter den schwersten Schilddrüsen kolloidarme und kolloidreiche, klein- und großfollikuläre. Hingegen scheint vielfach eine gewisse Übereinstimmung der Kolloid- und der Follikelkurve mit den Jodkurven zu bestehen. In den einzelnen Kurvenabschnitten steigen und fallen die betreffenden Kurven vielfach miteinander. Besonders bei den leichtesten und bei den schwersten Schilddrüsen läßt sich dies feststellen, weniger bei den mittleren Gewichten.

Wir besitzen unter Ausschaltung der beiden fötalen Schilddrüsen für 65 Schilddrüsen Angaben über den Kolloidgehalt, und für 64 Drüsen solche über die Follikelgröße. Wenn wir sie nach dem Jodgehalt in zwei Gruppen einteilen, so erhalten wir eine Verteilung nach dem Kolloidgehalt und der Follikelgröße, wie sie in der folgenden Tabelle durch die nicht eingeklammerten Zahlen wiedergegeben ist.

Tabelle II.

Beziehungen zwischen Jodgehalt, Kolloidgehalt und Follikelgröße.

Stufe	Kolloid		Follikel	
	jodärmer	jodreicher	jodärmer	jodreicher
6	1 (1)	4 (4)	0 (0)	1 (1)
5	21 (21)	23 (23)	11 (11)	17 (17)
4	4 (4)	1 (1)	10 (10)	7 (7)
3	5 (4)	2 (1)	5 (5)	3 (3)
2	1 (1)	0 (0)	4 (4)	2 (1)
1	1 (0)	2 (0)	2 (0)	2 (0)

Wenn wir die Schilddrüsen der vier norwegischen Tiere und der Jersey-Kuh ausschalten, erhalten wir die in Klammern gesetzten Zahlen. Diese Ausschaltung rechtfertigt sich insofern, als wir hier im Vergleich zu dem übrigen Material unnormale Drüsen vor uns haben. Die Schilddrüsen der beiden einjährigen norwegischen Stiere (Nr. 72 und 78) zeichnen sich dadurch aus, daß sie bei ziemlich hohem Jodgehalt kolloidarm und kleinflöckig sind. Ebenfalls jodreich, aber von mäßigem Kolloidgehalt und mit kleinen bis mittelgroßen Follikeln ist die Schilddrüse der zehnjährigen norwegischen Kuh (Nr. 31), während die 15- bis 16-jährige norwegische Kuh (Nr. 18) bei geringem Jodgehalt der Drüse ebenfalls einen mäßigen Kolloidgehalt und kleine Follikel aufweist. Die sklerotische Schilddrüse der Jersey-Kuh (Nr. 11) ist bei niedrigem Jodgehalt kolloidarm und kleinflöckig.

Bereits bei Berücksichtigung aller Drüsen, deutlicher noch unter Ausschaltung der genannten fünf, ergibt sich, daß tatsächlich ein Zu-

sammenhang zwischen dem Jodgehalt der Drüse einerseits und ihrem Kolloidgehalt und ihrer Follikelgröße andererseits besteht in dem Sinne, daß im allgemeinen unter den jodärmeren Schilddrüsen mehr kolloidärmere und kleinerfollikuläre auftreten, als unter den jodreicheren. Dies läßt sich noch deutlicher zeigen, wenn wir die Kolloidmengen und Follikelgrößen in je zwei Gruppen einteilen, in je eine Gruppe mit viel und sehr viel Kolloid bzw. große und sehr große Follikel (Stufe 5 und 6) und in je eine Gruppe mit weniger Kolloid bzw. kleineren Follikeln (Stufe 1 bis 4), und wenn wir diese Zahlen gleich noch in Prozente umrechnen. Die Prozentzahlen sind in Klammern gesetzt. Wir haben dann:

Stufe	Kolloid		Follikel	
	jodärmer	jodreicher	jodärmer	jodreicher
5 und 6	66 (70)	84 (97)	34 (37)	56 (62)
1 bis 4	33 (30)	16 (3)	66 (63)	44 (38)

Diese Differenzen sind zu groß, als daß sie vom Zufall herrühren könnten. Es dürfte eine Gesetzmäßigkeit vorliegen, die sich aber natürlich nicht durchweg nachweisen läßt, weil die untersuchten Schilddrüsen in ihrer überwiegenden Zahl mit viel Kolloid und mit großen Follikeln ausgestattet sind.

C. Die Beurteilung des Materials vom Standpunkt der Rassenfrage.

Nachdem wir einen allgemeinen Überblick über die von uns untersuchten Schilddrüsen ohne Berücksichtigung der Rasse und der Herkunft gewonnen haben, wollen wir nun dazu übergehen, die Tiere einerseits nach Rassen, andererseits nach Ländern einzuteilen, um zu untersuchen, welche Beziehungen sich dabei ergeben.

Die Kurventafel Nr. 1 zeigt uns über die Verteilung nach steigenden DrüsenGewichten folgendes.

Die leichtesten Drüsen finden sich bei der Shorthornrasse. Immerhin kommen hier verstreut auch einige schwere Drüsen vor, bis zu einer Struma, die an viertletzter Stelle in der Tabelle steht.

Die Simmentaler Rasse weist keine ganz leichten und keine sehr schweren Drüsen auf; ihre Vertreter verteilen sich im übrigen sehr gleichmäßig auf alle vorhandenen Gewichte.

Die Braunviehrasse tritt erst mit etwas höheren Gewichten auf, als die Simmentaler Rasse. Sie endigt mit ähnlichen Gewichten, wenn wir die beiden allerschwersten Drüsen unberücksichtigt lassen. Die Pinzgauer Rasse beginnt mit leichteren Drüsen als die Simmentaler und endigt mit den schwersten Drüsen. Sie überdeckt gewissermaßen die beiden eben genannten Rassen. Das kann aber damit zusammenhängen, daß mehr Drüsen von dieser Rasse untersucht worden sind.

Von den übrigen Rassen läßt sich nicht leicht etwas Allgemeines sagen, da zu wenig Schilddrüsen untersucht worden sind. Immerhin verteilen sich die vier Eringer und die vier Norweger Drüsen auf ungefähr die gleichen Gewichte wie die Pinzgauer. Es kommen also bei diesen beiden Rassen leichte und schwere Gewichte vor; welche an der Zahl überwiegen, wissen wir nicht.

Wie groß die Streuung der Gewichte bei unseren vier Hauptrassen ist, sehen wir am besten auf der Kurventafel Nr. 2. Hier sind die aufeinander folgenden Schilddrüsen nicht in gleichen Abständen, sondern entsprechend ihren Gewichten auf die Ordinatenachse eingetragen. Allerdings sind dieses Mal die fettfreien Trockengewichte verwendet worden; das ändert aber prinzipiell nichts an der Sache.

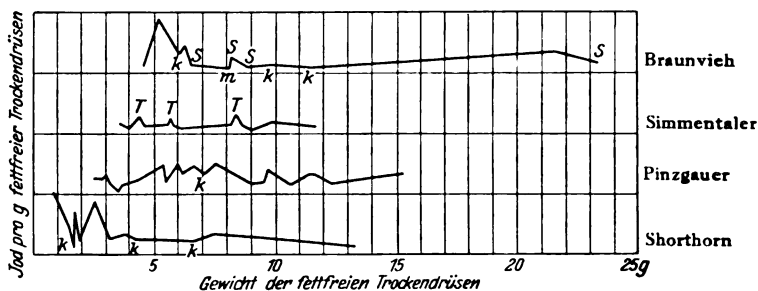


Abb. 2.

S = Schweiz. T = Tirol. k = kastriert.

Die Kurven geben uns ein unmittelbares Bild über die Verteilung der Schilddrüsen der einzelnen Rassen nach ihren Gewichten. Wir sehen hier, innerhalb welcher Gewichtsgrenzen sich die Drüsen der vier Rassen bewegen, mit welchen Gewichten sie beginnen und aufhören. Wenn wir die untersuchten Drüsen in eine leichtere und eine schwerere Hälfte einteilen, so ergibt sich folgendes, wenn wir von den extrem schweren Drüsen, zwei Braunviehdrüsen und einer Shorthorndrüse absehen. Bei den Simmentaler Drüsen nehmen die beiden Hälften einen gleich großen Raum ein, die Streuung ist durch die ganze Kurve hindurch ungefähr gleich; die leichtere Hälfte der Drüsen erstreckt sich über ein gleiches Gewichtsintervall, wie die schwerere. Ähnlich steht es beim Braunvieh. Die zweite Hälfte beansprucht nur wenig mehr Raum, als die erste. Bei den Pinzgauer Drüsen hingegen ist die leichtere Hälfte der Drüsen auf ein Drittel, bei den Shorthorndrüsen auf ein Viertel zusammengedrängt.

Nach Müller (5) und nach Naef (6) sind inkonstante Schilddrüsen-gewichte einer Gegend typisch für Kropfdisposition. Wenn wir dies Prinzip auf unsere Rassen anwenden wollten, so hätten wir zwar überall

recht inkonstante Gewichte, folglich Kropfdisposition. Die Zusammendrängung eines Großteils der Drüsen auf ein kleines Gewichtsintervall dürfte aber vielleicht doch als erste Annäherung an eine Gewichtskonstanz aufgefaßt werden. In diesem Sinne könnte man die Shorthorn- und die Pinzgauer Rinder als weniger zum Kropf disponiert annehmen, als die Braunvieh- und Simmentaler Rinder. Dies würde auch damit übereinstimmen, daß die Drüsen der beiden ersteren Rinderrassen mit niedrigeren Gewichten beginnen, und daß auch ihre Durchschnittsgewichte niedriger sind. Diese betragen, unter Berücksichtigung der vorhin erwähnten Weglassungen für Shorthorn 3,04, Pinzgauer 6,65, Braunvieh 7,49 und Simmentaler 7,05 g als fettfreie Trockendrüse. Als weiteres Merkmal kann auch der Jodgehalt herbeigezogen werden. Dieser ist, auf fettfreie Drüse bezogen, wie wir unten sehen werden (s. Tabelle III), bei den Shorthorndrüsen am höchsten und nimmt über die Pinzgauer, Braunvieh zu den Simmentalern ab.

Da nun aber unsere Shorthorndrüsen alle aus England, die Pinzgauer aus Salzburg, die Braunviehdrüsen hauptsächlich aus Tirol und die Simmentaler vorwiegend aus der Schweiz stammen, können die genannten Eigentümlichkeiten ebensogut von der geographischen Verbreitung wie von der Rasse stammen. Wir können also vorderhand lediglich feststellen, daß bei den verschiedenen Gruppen tatsächlich Unterschiede im erwähnten Sinne auftreten, ohne daß wir sagen könnten, ob sie durch die Rasse oder durch die örtliche Herkunft bedingt sind.

Nach dem allgemeinen Verlauf der Jodkurven in der Kurventafel Nr. 1 hatten wir bereits den Schluß gezogen, daß der Jodgehalt der Schilddrüsen in Abhängigkeit stehe zum Schilddrüsengewicht. Die Kurventafel Nr. 2 zeigt uns nun, wie sich die von uns untersuchten Drüsen der einzelnen Rassen in dieser Beziehung verhalten. Sie gibt, wir erwähnt, die Jodgehalte pro Gramm fettfreier Trockensubstanz in Beziehung zum steigenden fettfreien Drüsen-trockengewicht wieder.

Bei der Simmentaler Rasse haben wir eine recht gleichmäßig verlaufende Kurve. Nur drei Punkte ragen höher hinauf. Diese drei Drüsen betreffen Tiroler Tiere (mit „T“ bezeichnet), während alle übrigen aus der Schweiz stammen. Nun sind aber die Tiroler Rinder alle männlich, die Schweizer Rinder alle weiblich. Man könnte daher vermuten, daß der erhöhte Jodgehalt bei gegebenem Schilddrüsengewicht mit dem Geschlecht zusammenhänge. Ein solcher Zusammenhang läßt sich aber an Hand der Drüsen der übrigen Rassen durchaus nicht feststellen. Also scheint der Unterschied in der Landesgegend begründet zu liegen. Wir hätten dann für Schweizer-Simmentaler Vieh (aus den Kantonen Bern und Freiburg) recht gleichmäßige relative Jodgehalte, trotz ziemlich starker Unterschiede im Schilddrüsen-

Tabelle III. Vergleich der Schilddrüsengewichte und Jodgehalte
der normalen und strumös vergrößerten Schilddrüsen, nach Rassen und Ländern geordnet.

	Nach Rassen geordnet						Nach Ländern geordnet				Dieselbe Rasse in verschiedenen Ländern			
	Short- horn	Finn- gauer	Sim- men- taler	Braun- vieh	Norwg. Land- vieh	Eringer und Duxer	England	Schweiz	Oester- reich	Simmentaler		Braunvieh		
										Schweiz	Tirol	Schweiz	Tirol	
Zahl der Drüsen	14	23	15	12	4	5	18	20	36	12	3	4	8	
Drüsengewichte:														
Minimum	8,7	15,1	18,4	28,0	20,0	15,4	8,7	15,4	15,1					
Maximum	83,0	90,9	55,2	130,4	93,5	125,9	83,0	125,9	130,4					
Mittel	22,4	41,3	37,9	54,1	55,6	60,5	24,4	44,0	45,0	38,5	33,5	49,0	56,5	
mg J pro g frischer Drüse:														
Minimum	0,09	0,05	0,08	0,023	0,02	0,05	0,09	0,05	0,023					
Maximum	0,53	0,41	0,29	0,71	0,28	0,38	0,58	0,19	0,71					
Mittel	0,28	0,24	0,15	0,19	0,14	0,10	0,27	0,12	0,24	0,18	0,25	0,15	0,21	
mg J pro g fettfreier Drüse:														
Minimum	0,63	0,31	0,37	1,48	0,12	0,23	0,42	0,33	0,28					
Maximum	5,11	2,46	1,61	4,58	2,24	1,09	5,11	1,42	4,58					
Mittel	2,01	1,47	0,77	1,16	1,05	0,61	1,85	0,68	1,44	0,62	1,38	0,80	1,34	
mg J in der ganzen Drüse:														
Minimum	1,13	1,09	2,02	2,31	1,22	2,69	1,13	2,02	1,09					
Maximum	12,60	25,1	13,2	34,5	18,8	6,55	13,8	13,4	34,5					
Mittel	5,65	10,7	5,57	10,9	7,5	4,67	4,57	10,88	5,61	4,84	8,66	8,55	12,08	
Normale Schilddrüsen (unter 30 g Gewicht)														
In %	11	7	4	2	1	1	13	5	9	3	1	1	1	
Strumen (über 30 g Gewicht)														
In %	79	30	27	18	25	20	72	25	25					
Strumen (über 30 g Gewicht)														
In %	3	16	11	10	3	4	5	15	27	9	2	3	7	
In %	21	70	78	82	75	80	28	75	75					

gewicht. Bei den Tiroler Rindern wären die Jodgehalte unter sich auch ähnlich, aber höher als bei den Schweizer Tieren.

Bei den übrigen Rassen finden wir keine solche Konstanz. Beim Braunvieh weisen 8 von den 12 untersuchten Schilddrüsen ebenfalls niedrige und unter sich ähnliche Jodgehalte auf, während vier Drüsen, und zwar hauptsächlich von den leichteren, bedeutend jodreicher sind. Unter den Tiroler Braunviehdrüsen finden sich niedrige und hohe Jodgehalte, von den vier Schweizer Drüsen (mit „S“ bezeichnet) ist eine jodreichere vorhanden.

Die Pinzgauer Rinder weisen im allgemeinen jodreichere Schilddrüsen auf als die Simmentaler Rinder. Die Kurve schwankt durch alle Gewichte hindurch unregelmäßig auf und ab.

Bei den Shorthornrindern sind ebenfalls sehr verschiedene Jodgehalte vorhanden, ähnlich wie beim Braunvieh. Auch hier sind es vornehmlich die leichteren Drüsen, welche relativ jodreich sind.

Wir müssen auch hier, wenn wir von Rassen sprechen, immer gleichzeitig an den Einfluß der Landesgegend denken.

In der Tabelle III haben wir die minimalen, maximalen und mittleren Schilddrüsenengewichte und Jodgehalte einerseits nach den Rassen, andererseits nach den Ländern geordnet wiedergegeben und auch die Anzahl der strumösen Schilddrüsen in jeder Gruppe angeführt. Ferner wurde die Simmentaler und die Braunvieh-Rasse in je zwei Gruppen nach der geographischen Herkunft eingeteilt, in eine Schweizer und eine Tiroler Gruppe.

Die Eringer Rinder, einschließlich des Duxer Stiers und der Norweger Rinder, haben wir zwar zum Vergleich mit angeführt; wir sind uns aber bewußt, daß unsere Durchschnittswerte bei der geringen Zahl der untersuchten Drüsen nichts besagen. Weggelassen haben wir die Hereford-, Jersey- und Red-Polled-Rasse mit nur einzelnen Drüsen. Bei den Ländern hingegen wurden alle Tiere berücksichtigt.

Fassen wir zunächst die Schilddrüsenfrischgewichte ins Auge. Das niedrigste Durchschnittsgewicht finden wir bei der Shorthornrasse. Dann folgt in ziemlich weitem Abstand die Simmentaler, dann die Pinzgauer und die Braunvieh-Rasse. Noch höhere Gewichte finden wir bei dem norwegischen Landvieh und schließlich bei der Eringer-Duxer Rassengruppe. Die Reihenfolge der vier ersten Gruppen ist also nicht genau gleich, wie bei den fettfreien Trockendrüsen.

Der durchschnittliche Jodgehalt, auf frische Schilddrüse bezogen, ist beim Eringer und Duxer Vieh am niedrigsten. Es folgen mit unter sich ähnlichen Werten norwegisches Landvieh und Simmentaler Vieh und dann in ungefähr gleichen Abständen Braunvieh, Pinzgauer und Shorthorn.

Auf fettfreie Trockensubstanz bezogen, ist die Reihenfolge beinahe dieselbe; nur haben norwegisches Landvieh und Simmentaler Rasse den Platz vertauscht.

Beim Gesamtjodgehalt ändert sich verschiedenes. Die Eringer Drüsen sind hier noch am jodärmsten. Dann folgt mit unter sich ganz ähnlichen Zahlen Simmentaler und Shorthorn. Die Shorthorndrüsen, welche, auf die Gewichtseinheit bezogen, am jodreichsten waren, zählen auf die ganze Drüse bezogen, zu den jodärmsten. Das hängt natürlich mit ihrem niedrigen durchschnittlichen Drüsengewicht zusammen. Auf die Shorthornrasse folgt in ziemlich weitem Abstand das norwegische Landvieh und in nochmaligem weiten Abstand die unter sich nahezu gleich jodhaltigen Pinzgauer und Braunvieh-Drüsen.

Bei Berücksichtigung der einzelnen Länder zeigt England die niedrigsten Schilddrüsengewichte; die Schweiz und Österreich weisen nahezu doppelt so hohe, unter sich gleiche Gewichte der Rinderschilddrüsen auf.

Der Jodgehalt pro Gramm frischer Drüse und pro Gramm fettfreier Trockendrüse ist bei den Schweizer Tieren am niedrigsten; bei den österreichischen sind die Werte ungefähr doppelt so hoch, bei den englischen noch etwas höher. Der Gesamtjodgehalt ist bei den englischen und schweizerischen Drüsen unter sich ungefähr gleich, bei den österreichischen ungefähr dreimal so hoch.

Die schweizerischen Schilddrüsen laufen somit bezüglich des Gewichts mit den österreichischen, bezüglich des Gesamtjodgehalts mit den englischen, während sie bezüglich des Jodgehalts pro Gramm frischer Substanz und pro Gramm fettfreier Trockensubstanz weitaus am tiefsten stehen. Der Jodgehalt der österreichischen Schilddrüsen ist in jeder Beziehung höher als der der schweizerischen Drüsen.

Suchen wir nun durch Vergleichung derselben Rassen in zwei verschiedenen Ländern zu erkennen, ob die eben erwähnten Unterschiede auf die geographische Verbreitung oder auf die Rassen zurückzuführen sind. Aus unserem teilweise recht spärlichen Material geht folgendes hervor. Das mittlere Schilddrüsengewicht ist bei den Simmentaler Tieren sowohl in der Schweiz als auch in Tirol bedeutend geringer als beim Braunvieh in diesen beiden Ländern. Das würde also für einen Rassenunterschied sprechen, der durch beide Länder hindurchgeht. Mit dem Jodgehalt jedoch verhält es sich anders. Die Schweizer Tiere zeigen bei beiden Rassen bedeutend niedrigere Jodgehalte als die entsprechenden Tiroler Tiere. Für den Jodgehalt scheint somit nach unseren Zahlen nicht die Rasse, sondern die Landesgegend maßgebend zu sein.

Das Verhältnis der normalen zu den strumösen Schilddrüsen geht nicht etwa Hand in Hand mit den mittleren Schilddrüsengewichten,

was auch nicht weiter zu erwarten ist. Während wir vorhin für das Simmentaler Vieh eine etwas größere Kropfdisposition angenommen hatten als für das Braunvieh, sehen wir, daß die tatsächliche Strumenhäufigkeit in der umgekehrten Reihenfolge steht.

Zusammenfassung.

Die von uns untersuchten 80 Rinderschilddrüsen weisen, abgesehen von zwei fötalen Schilddrüsen, Gewichte von 8,7 bis 130,4 g auf, und zwar fallen die niedrigeren Gewichte vorwiegend auf englische Drüsen der Shorthornrasse aus den Schlachthäusern von Cambridge und Liverpool, die schwereren auf schweizerische und österreichische Drüsen der Simmentaler, Braunvieh- und Pinzgauer Rasse aus den Schlachthäusern Bern, Thun und Innsbruck.

Der relative Jodgehalt ist im allgemeinen nicht deutlich abhängig vom Drüsengewicht. Immerhin haben wir bei der Braunvieh- und der Shorthornrasse bei den leichteren Drüsen mehr höhere relative Jodgehalte gefunden, als bei den schweren Drüsen. Die Drüsen der Simmentaler und Pinzgauer Rasse zeigten dieses Verhalten nicht.

Der absolute Jodgehalt steigt im allgemeinen mit steigendem Schilddrüsengewicht.

Beziehungen zwischen Kolloidgehalt und Follikelgröße zum Schilddrüsengewicht konnten wir nicht feststellen, wohl aber scheinen Beziehungen zum Jodgehalt zu bestehen. Unter den jodärmeren Schilddrüsen fanden sich mehr kolloidarme und kleinfollikuläre, als unter den jodreicheren.

Bei den einzelnen Rassen zeigten sich Unterschiede in der Streuung der Schilddrüsengewichte und im relativen Jodgehalt der Drüsen, von denen es sich einstweilen nicht sagen läßt, ob sie wirklich Rassen-eigentümlichkeiten darstellen oder aber mit der Herkunft der Tiere zusammenhängen. Die eingangs erwähnte Frage, deren Beantwortung diese Arbeit dienen sollte, nämlich die Ermittlung der Rassenvariationen der Schilddrüsenbeschaffenheit, läßt sich somit an Hand unseres Materials nicht mit Sicherheit entscheiden, ebensowenig die Frage, inwieweit konstitutionelle und konditionelle Faktoren dabei mitspielen.

Wenn wir die Zusammendrängung eines Großteils der Drüsengewichte auf ein kleines Gewichtsintervall, wenn wir niedrige Anfangs- und Durchschnittsdrüsengewichte, wenn wir hohe durchschnittliche relative Jodgehalte als Characteristica einer geringeren Kropfdisposition betrachten wollen als die entgegengesetzten Merkmale, so zeigt die Shorthornrasse die geringste, die Pinzgauer, Braunvieh- und Simmentaler Rasse in der Reihenfolge der Aufzählung größere Kropfdisposition. Wir können aber nicht entscheiden, ob hier wirklich die Rasse und nicht die Herkunftsgegend maßgebend ist.

Als Rassenmerkmal, welches für die Schweiz und für Tirol gleichzeitig zutrifft, könnten die durchschnittlich niedrigeren Schilddrüsen-gewichte der Simmentaler Tiere gegenüber den Braunviehtieren angesehen werden. Unser diesbezügliches Material ist aber zu gering, um die Frage zu entscheiden.

Wohl das überraschendste Resultat unserer Untersuchung ist der geringe Zusammenhang, den wir zwischen dem Schilddrüsen-gewicht und dem Jodgehalt der Schilddrüsen gefunden haben, der Befund, daß die Drüsen aus zwei Ländern im Gewicht ähnlich sein können, obschon das eine Land (Österreich) durchschnittlich viel jodreichere Drüsen aufweist als das andere Land (Schweiz). Es scheint also, falls wir nicht durch Zufallswerte infolge zu geringen Materials irregeführt werden, als ob der erhöhte Jodgehalt hier keine Verminderung des Drüsen-gewichtes bewirkt habe. Das ist uns ein Fingerzeig dafür, daß, wie schon *Wegelin* annimmt, das Kropfproblem wohl noch mit anderen Faktoren zusammenhängen dürfte, als nur mit dem Jodgehalt der Umwelt, bzw. daß je nach den äußeren Umständen, vielleicht Klimafaktoren, ein anderer Jodgehalt notwendig ist, um eine gewisse Herabsetzung des Schilddrüsen-gewichts zu bewirken.

Literatur.

1) *Bang*, Mikromethoden zur Blutuntersuchung, 4. u. 5. Aufl. J. F. Bergmann, München und Wiesbaden. — 2) *von Fellenberg*, Prüfung von Würsten auf Wasserzusatz, Mitt. d. eidgen. Gesundheitsamtes 1918. — 3) *Derselbe*, Untersuchungen über das Vorkommen von Jod in der Natur, diese Zeitschr. **189**, 1923. — 4) *Krupski*, Beiträge zur Physiologie und Pathologie des endokrinen Systems. I, Schweizer Arch. f. Tierheilkunde **68**, 1921. — 5) *Müller*, Jod-, Chlor- und Calciumbestimmungen an normalen und an kropfig veränderten Schilddrüsen, Diss. Zürich 1922. — 6) *Naef*, Studien über Blutgerinnung, Blutalkaleszenz und Schilddrüse, ungedruckte Diss. (vet.) Bern 1926. — 7) *Studer*, Zur Kenntnis endokriner Organe bei Haustieren, Diss. Zürich 1925. — 8) *Wegelin*, Die Schilddrüse, Handb. d. spez.-path. Anat. v. *Henke-Lubarsch* 8. Berlin 1926. —

Weitere für die Arbeit benutzte, jedoch nicht zitierte Publikationen.

Abelin, Beziehungen des Jods zur Schilddrüsenwirkung, Klin. Wochenschrift **6**, 1927. — *Baumann*, Über das normale Vorkommen von Jod im Tierkörper (I. u. II. Mitteilung), Zeitschr. f. physiol. Chem. **21**, 1895/96. — *Derselbe*, Über den Jodgehalt der Schilddrüsen von Menschen und Tieren. (III. Mitteilung), ebendasselbst **22**, 1896/97. — *Clerc*, Über den endemischen Kropf des Schweines, Beitr. z. path. Anat. u. z. allgem. Pathol. **76**, 1927. — *Duerst*, Die konstitutionelle Beeinflussung der Leistungen beim Rinde und die praktischen Hilfsmittel zur Selektion, Züchtungskunde **2**, 1927. — *Gyger*, La Thyroïde de la chèvre à Berne et dans les environs, Diss. Bern 1925. — *Maurer, Ducrue, Palosoff*, Untersuchungen über das Vorkommen von Jod im menschlichen und tierischen Organismus, Münch. med. Wochenschrift 1927. — *Nozinic*, Über den Kropf des Menschen in Bern, Diss. Bern 1921.

Bestimmung organischer Stoffe durch Chromsäureoxydation.

Von

Th. von Fellenberg.

(Aus dem Laboratorium des eidgenössischen Gesundheitsamtes.)

(Eingegangen am 8. Juli 1927.)

In der vorhergehenden Arbeit habe ich eine Anwendung der ursprünglich von *I. Bang*¹ zur Mikrobestimmung von Fett empfohlenen Oxydationsmethode beschrieben. Es handelte sich dort um die Trockensubstanzbestimmung von Schilddrüsen bzw. um die Bestimmung des Schilddrüseneiweißes. Ich versuchte nun, zu berechnen, ob die Verbrennung von Eiweiß unter den gewählten Versuchsbedingungen quantitativ bis zu CO_2 erfolge. Es zeigte sich, daß dies längst nicht der Fall ist, daß bedeutend weniger Chromsäure verbraucht wird, als der vollständigen Verbrennung entsprechen würde. Ich suchte mir nun Rechenschaft zu geben, wie sich andere chemische Verbindungen dem Chromsäurereagens gegenüber verhalten in der Hoffnung, daß sich daraus da und dort Anwendungen für die Lebensmittelanalyse und die Biochemie ergeben würden.

Obschon ja bei den meisten organischen Verbindungen bekannt ist, ob und in welcher Weise sie durch Chromsäure angegriffen werden, ist diese Eigenschaft doch noch verhältnismäßig selten zur analytischen Bestimmung herangezogen worden.

Bedeutend älter als das *Bangsche* Fettbestimmungsverfahren ist die Methode der Glycerinbestimmung von *Legler*. Eine Vorschrift dafür, von *Hegner* stammend, findet sich bei *Benedikt-Ulzer*². Danach wird 2 Stunden mit Bichromat und Schwefelsäure gekocht und schließlich mit Ferroammoniumsulfat zurücktitriert. Ferner ist eine Alkoholbestimmungsmethode von *E. Martin*³ zu erwähnen, welche auf der Oxydation des Alkohols zu Essigsäure und ebenfalls Rücktitration des überschüssigen

¹ *Ivar Bang*, Mikromethoden zur Blutuntersuchung, 4. u. 5. Aufl., S. 38. J. F. Bergmann, München und Wiesbaden. 1922.

² Analyse der Fette und Wachse.

³ *E. Martin*, Chimie et Industrie, Quatrième Congrès de Chimie Industrielle, 1925, S. 589.

Bichromats mit Ferroammoniumsulfat unter Tüpfeln mit Ferricyankalium beruht, nachdem bereits frühere Autoren¹ kolorimetrisch vorgegangen sind, indem sie aus der Farbänderung der Chromsäure auf den Alkoholgehalt geschlossen haben. *M. Martini* und *A. Nourrisson*² haben die Methode von *E. Martin* insofern modifiziert, als sie zur jodometrischen Rücktitration übergegangen sind. Sie empfehlen die Methode speziell zur Bestimmung des Alkoholgehalts von Essig. In Amerika soll laut Tageszeitungen die Methode in ihrer kolorimetrischen Form neuerdings dazu dienen, den Alkoholnachweis in der Ausatemungsluft von Personen zu erbringen, die eines Rausches verdächtig sind.

Ich hielt mich bei meinen Untersuchungen stets an einen bestimmten Arbeitsgang. Wasserlösliche Stoffe werden in wässriger Lösung, unlösliche Säuren als Alkalisalze, basische Stoffe eventuell in schwefelsaurer Lösung angewendet. Bei in Wasser schwer löslichen, in starker Schwefelsäure aber löslichen Stoffen, wie gewissen höheren Alkoholen kann die Substanz als solche mit einer Mikropipette abgemessen werden. Fette werden mit alkoholischer Kalilauge verseift, die gewünschte Menge wird abgemessen und zur Vertreibung des Alkohols im Reaktionsgefäß selbst abgedampft. Ähnlich läßt sich bei unlöslichen Proteinstoffen vorgehen.

Die Konzentration der Lösungen wird am besten so gewählt, daß im Kubikzentimeter einige Zentigramme der Substanz enthalten sind. Für jede Bestimmung mißt man mit einer genauen, in hundertstel Kubikzentimeter eingeteilten Pipette so viel Flüssigkeit ab, wie etwa 3 bis 6 mg Substanz entspricht. Man gibt die Flüssigkeit in einen 50-cm-Erlenmeyerkolben. Falls ein organisches Lösungsmittel, wie Alkohol, entfernt werden muß, kocht man über freier Flamme genau bis zur Trockne ab. Dann gibt man 10 cm n/10 Bichromatlösung hinzu und gießt vorsichtig unter Umschwenken aus einem Meßzylinder 20 cm konzentrierter Schwefelsäure hinzu. Betrug die zu untersuchende Flüssigkeitsmenge mehr als 1 cm, so vermehrt man die Schwefelsäuremenge entsprechend, indem man für jeden Kubikzentimeter wässriger Lösung 2 cm Schwefelsäure nimmt.

Die Flüssigkeit nimmt einen bräunlichgrünen bis olivgrünen Ton an; ist sie rein grün, so hat die Bichromatmenge nicht genügt. Man setzt entweder noch einige Kubikzentimeter Bichromatlösung und die doppelte Menge Schwefelsäure hinzu oder wiederholt den Versuch mit weniger Substanz.

Nach $\frac{1}{4}$ Stunde oder auch beliebig später wird die Flüssigkeit in einen geräumigen Kolben gegossen und mit Wasser gut nachgespült. Man verdünnt auf 300 bis 350 cm, wobei man Brunnenwasser verwenden kann. Man läßt einige Minuten stehen, bis keine Luftblasen mehr sichtbar sind, und setzt dann etwa 0,2 g Kaliumjodid hinzu und schwenkt um. Das durch die überschüssige Chromsäure in Freiheit gesetzte Jod wird nach etwa 2 Minuten tropfenweise mit n/10 Natriumthiosulfatlösung zurücktitriert. Den Stärkeindikator setzt man am besten erst gegen Schluß der Titration hinzu. Falls zur Rücktitration weniger als 2 cm Thiosulfatlösung

¹ Vgl. *L. Roos*, *Annales des Falsifications* 17, 410, 1924.

² Ebendasselbst 18, 235, 1925.

verbraucht worden sind, ist Gefahr vorhanden, daß der Chromsäureüberschuß zu gering war. Ein blinder Versuch gibt den Titer der Thiosulfatlösung an.

Wie bekannt ist, verhalten sich die organischen Verbindungen verschieden gegenüber Chromsäure. Einige wenige Verbindungen, wie Essigsäure und Oxalsäure, werden nicht angegriffen, andere werden quantitativ zu CO_2 verbrannt, wieder andere werden partiell verbrannt unter Bildung von Essigsäure. Bei manchen Verbindungen stellt sich unter unseren Versuchsbedingungen kein genaues stöchiometrisches Verhältnis ein. Es scheint, daß hier die Verbrennung etwas rascher vor sich geht, als die Bildung der Essigsäure aus den zerfallenden Molekülen, so daß eine Anzahl Moleküle verbrannt werden, bevor sie Gelegenheit zur Bildung der resistenten Essigsäure finden. Das Verhältnis bleibt dabei dasselbe, ob viel oder wenig Material verbrannt wird. So fand man bei Propionsäure für 2 mg 1,19, 4 mg 1,16 und 6 mg 1,06 ccm n/10-Chromsäure pro Milligramm. Bei Isovaleriansäure fand man für 1 mg 1,95, 2 mg 1,99, 3 mg 1,96 und 4 mg 1,89 ccm n/10 pro Milligramm. Die etwas niedrigeren Werte am Schluß der Reihen rühren davon her, daß die Substanzmenge bereits etwas zu groß ist im Verhältnis zur Chromsäure.

Auch die Schwefelsäuremenge ändert, falls sie innerhalb nicht allzu weiter Grenzen variiert wird, wenig am Resultat. So ergab Isovaleriansäure bei Verwendung von 12 ccm konzentrierter H_2SO_4 1,63, mit 16 ccm H_2SO_4 1,91, mit 20 ccm 1,96 und mit 24 ccm 1,98 ccm n/10 Chromsäureverbrauch. Das Abweichen von 20 % nach oben und unten von der vorgeschriebenen Säuremenge ändert beinahe nichts am Resultat.

In der Tabelle I bringen wir den Chromsäureverbrauch einer Reihe verschiedenartiger organischer Verbindungen.

Von den Fettsäuren wird die Ameisensäure quantitativ zu CO_2 verbrannt; die Essigsäure wird, wie bereits erwähnt, nicht angegriffen. Bei der Propionsäure und Buttersäure wird mehr Sauerstoff verbraucht, als der Bildung von Essigsäure entsprechen würde, und zwar bei der Propionsäure genau 1 Atom, bei der Buttersäure genau 0,5 Atome mehr. Ob dieser stöchiometrisch genaue Überschuß, dem wir auch beim Isobutylalkohol wieder begegnen werden, eine theoretische Bedeutung hat oder zufällig ist, habe ich vorläufig nicht weiter untersucht.

Bei den höheren Fettsäuren werden die Verhältnisse bereits recht kompliziert. Ich möchte bei anderer Gelegenheit näher darauf eingehen.

Die Oxysäuren, Äpfelsäure, Weinsäure, Citronensäure verbrennen alle quantitativ zu CO_2 . Oxalsäure wird nicht angegriffen, Bernsteinsäure nur sehr wenig.

Tabelle I.
Chromsäureoxydation einiger Verbindungen.

	Gefunden n/10 K ₂ Cr ₂ O ₇ pro mg	Entspricht:	Berechnet n/10 K ₂ Cr ₂ O ₇ pro mg	Atome O pro Molekül verbraucht
Ameisensäure . . .	0,47	vollständ. Verbr.	0,434	
Essigsäure	0,0017	—	—	
Propionsäure . . .	1,08	1 Mol. Eg.	0,81	4 statt 3
n-Buttersäure . . .	1,68	1 " "	1,68	7,5 statt 7
Isovaleriansäure . .	1,96	1 " "	1,96	
Äpfelsäure	0,896	vollständ. Verbr.	0,895	
Weinsäure	0,650	" "	0,667	
Citronensäure . . .	0,845	" "	0,857	
Oxalsäure	0	—	—	
Bernsteinsäure . . .	0,15	vollständ. Verbr.	1,19	
Traubenzucker . . .	1,29	" "	1,34	
Rohrzucker	1,39	" "	1,40	
Milchzucker	1,29	" "	1,34	
Glycerin	1,48	" "	1,52	
Mannit	1,36	" "	1,39	
Methylalkohol . . .	1,85	" "	1,87	
Äthylalkohol	0,87	1 Mol. Eg.	0,87	
Propylalkohol . . .	1,54	1 " "	1,67	
Isobutylalkohol . .	2,44	1 " "	2,16	9 statt 8
Isoamylalkohol (Gärungsamylalk.)	1,51	1 " "	2,50	
Dimethyläthylencarbinol	1,94	2 " "	1,59	8,5 statt 7
Benzoessäure	2,59	vollständ. Verbr.	2,46	
Salicylsäure	1,80	annäh. vollst. Verbr.	2,03	
Glykokoll	0,027	kaum angegriffen	0,80	
Alanin	0,026	" "	1,35	
Tyrosin	1,94	annäh. vollst. Verbr.	2,1	
Eieralbumin	1,12	—	—	
Gelatine	0,99	—	—	
Casein, techn. . . .	1,08	—	—	
Gluten, Kleber, tech.	1,19	—	—	

Die löslichen Kohlehydrate und die mehrwertigen Alkohole werden alle quantitativ verbrannt. Von den einwertigen Alkoholen wird einzig der Methylalkohol vollständig verbrannt. Äthyl-, Propyl-, Isobutyl- und Isoamylalkohol bilden je ein Molekül Essigsäure. Bei Isobutylalkohol wird indes genau ein Molekül Sauerstoff mehr verbraucht, als dieser Berechnung entspricht. Dimethyläthylencarbinol scheint zwei Moleküle Essigsäure zu bilden, wobei aber auch wieder etwas mehr Sauerstoff verbraucht wird, als sich berechnet.

Die aromatischen Säuren verbrennen gut, Benzoessäure quantitativ, Salicylsäure nahezu quantitativ.

Die Aminosäuren Glykokoll und Alanin sind nahezu vollständig resistent gegen Chromsäure; erstere verbraucht 3%, letztere 2% der theoretischen Menge. Man muß sich natürlich fragen, ob dieser kleine

Verbrauch nicht etwa durch eine Verunreinigung vorgetäuscht worden ist, ob die genannten Aminosäuren nicht vollständig unverbrennlich durch unser Reagens sind. Bei Tyrosin ist die Verbrennung sehr weitgehend, aber nicht ganz quantitativ.

Die Eiweißkörper geben etwas verschiedene Werte. Den niedrigsten Wert finden wir bei der glykokollreichen Gelatine.

Die Anwendungsmöglichkeiten der Oxydationsmethode sind zahlreich. Vor allem eignet sie sich da, wo ein in kleiner Menge vorhandener Stoff bestimmt werden soll oder so wenig Material vorliegt. Ich möchte dies am Beispiel der Alkoholbestimmung in Essig zeigen.

Von den Essigen wurden je 10 ccm destilliert, bis genau 6 ccm übergegangen waren. Die Oxydation wurde mit je 1 ccm Destillat = $\frac{6}{10}$ ccm Essig vorgenommen. 1 mg Äthylalkohol entspricht 0,87 ccm n/10 Bichromat. Man fand folgende Werte.

	n/10 $K_2Cr_2O_7$ im Destillat	g Alkohol in 100 ccm	Vol.-% Alkohol
Essig, weiß	2,75	0,316	0,397
Weinessig, weiß	2,10	0,241	0,304
„ rot	4,55	0,522	0,645
Essigsprit, unverdünnt . . .	0,36	0,041	0,052

Die Doppelbestimmungen gaben in allen vier Fällen auf den Tropfen dasselbe Resultat. Da wir bei der Bestimmung dreizifferige Zahlen haben, kann die zweite Dezimale des Resultats als sicher angesehen werden. Die Genauigkeit ist somit größer als bei der Berechnung des Alkohols aus dem spezifischen Gewicht. Das gilt natürlich nur bei den niedrigen Gehalten; bei den höheren ist der Bestimmung des spezifischen Gewichts der Vorzug zu geben. Der Alkoholgehalt der Weine mag etwa die Grenze sein, wo sich die Oxydationsmethode noch bequem eignet¹.

Vorzüglich geeignet ist die Methode natürlich auch zur Alkoholbestimmung in alkoholfreien Weinen und anderen Flüssigkeiten, die auf geringen Gehalt an Alkohol zu prüfen sind.

Bei unseren Essigen haben wir auch die Reduktionswirkung direkt, d. h. vor der Destillation, bestimmt. Nach Feststellung des geeigneten Faktors ließe sich daraus nach Abzug der für den Alkohol verbrauchten Chromsäure der Extraktgehalt berechnen. Es wurde gefunden pro Kubikzentimeter Essig:

	Gesamt- verbrauch an $K_2Cr_2O_7$	Abzüglich Destillat n/10 $K_2Cr_2O_7$
Essig, weiß	14,7	11,95
Weinessig, weiß	17,9	15,8
„ rot	11,3	6,75
Essigsprit, unverdünnt . . .	3,62	3,62
Essig-Essenz, unverdünnt . .	14,8	—

¹ Vgl. E. Martin, l. c.

Über die Echtheit der vorliegenden Produkte geben wir kein Urteil ab.

Unsere Oxydationsmethode eignet sich ferner zur Analyse von Mischungen von Methyl- und Äthylalkohol überall da, wo der Methylalkohol in relativ großer Menge vorkommt. Bei kleinen Methylalkoholgehalten wird man eher zu einer kolorimetrischen Methode greifen.

Methylalkohol wird, wie unsere Tabelle zeigt, durch unsere Chromsäuremischung quantitativ zu CO_2 verbrannt und braucht dabei pro Milligramm 1,87 ccm n/10 Bichromat, während Äthylalkohol nur zu Essigsäure oxydiert wird und dabei 0,87 ccm verbraucht.

Das spezifische Gewicht der beiden Alkohole ist sehr ähnlich. Wenn der Gesamtalkohol aus dem spezifischen Gewicht nach der Äthylalkoholtabelle ermittelt ist und man den Chromsäureverbrauch pro Milligramm des Alkoholgemisches bestimmt, so läßt sich der Methylalkoholgehalt leicht berechnen. Man kann dafür die allgemeine Formel

aufstellen: $M = \frac{100}{D} (n - a)$, wobei D = Differenz zwischen dem Chromsäureverbrauch der beiden vorhandenen Stoffe, in n/10 ccm pro Milligramm ausgedrückt, in unserem Falle also $1,87 - 0,87 = 1,00$, n = Gefundener Chromsäureverbrauch pro Milligramm, a = Chromsäureverbrauch pro Milligramm Äthylalkohol = 0,87.

Vereinfacht lautet die Formel in unserem Falle: $M = 100 (n - 0,87)$.

Es wurden Mischungen von Methyl- und Äthylalkohol geprüft, um die ungefähre Fehlergröße zu ermitteln. Man stellte sich Mischungen bestimmter Gewichtsmengen der beiden Alkohole her und fand folgende Werte:

Gewichtsteile Methylalkohol	40	60	80
Gewichtsteile Äthylalkohol	60	40	20
ccm n/10 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ pro Milligramm Mischung . .	1,28	1,43	1,675
abzüglich	0,87	0,87	0,87
	=	0,41	0,60 0,805
somit ist der Methylalkoholgehalt	41 %	60 %	80,5 %
Fehler	1 %	0 %	0,5 %

Der Fehler würde sich bei unbekannten Mischungen etwas vergrößern, da der Gesamtalkoholgehalt aus der Äthylalkoholtabelle entnommen werden müßte, was nicht absolut richtig ist. Jedenfalls ist die Methode brauchbar, um den ungefähren Methylalkoholgehalt zu ermitteln.

Genau in gleicher Weise kann man nun überall da vorgehen, wo zwei bekannte Verbindungen, deren Summe bekannt ist, nebeneinander bestimmt werden sollen, falls ihr Chromsäureverbrauch stark differiert. Die Berechnung erfolgt dann nach der oben gegebenen allgemeinen Formel.

Die Möglichkeit, die Oxydationsmethode zur Extraktbestimmung zu verwenden, wurde bereits erwähnt. Ich bestimmte den Extrakt in einigen Proben Tee nach diesem Verfahren.

Je 2 g Tee wurden nach der Vorschrift des schweizerischen Lebensmittelbuches mit 200 ccm siedendem Wasser übergossen und nach 3 Minuten langem Ziehen abgessen. Die Oxydation erfolgte mit je 2,5 ccm Flüssigkeit, entsprechend 25 mg Tee. Die Berechnung geschah unter der aus den Analysen selbst sich ergebenden Annahme, daß 1 mg aschefreier Tee-extrakt 1,37 ccm n/10 Bichromat verbraucht. Unsere Werte sind:

Bezeichnung	Aschenfreier Extrakt direkt bestimmt	n/10 ccm $K_2Cr_2O_7$ für 25 mg Tee	Aschenfreier Extrakt daraus berechnet
Tee Ceylon Pekoe	17,90	6,15	18,0
Tee Souchong pur China	11,32	3,75	10,95
Tee verfälscht, Ziegeltee u. extrahiert	9,82	3,38	9,87
Tee verfälscht, Teeabfälle	8,54	2,93	8,55

Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Methode könnten sich in der Serologie und Immunitätsforschung finden lassen, wo es sich darum handelt, den Eiweißgehalt einer Lösung kennenzulernen, von der nur wenig Material vorhanden ist, oder wo der Gehalt einer Bakterienaufschwemmung bestimmt werden soll. Ich habe mich überzeugt, daß Preßhefe mit Leichtigkeit durch unser Chromsäurereagens verbrannt wird, und dasselbe wird auch für Bakterien der Fall sein. Man kann sich also mit wenigen Milligrammen Material und in kürzester Zeit Rechenschaft über den Gehalt geben, vorausgesetzt, daß der Nährboden quantitativ entfernt ist. Solche Aufschwemmungen sollte man aber nicht etwa eintrocknen lassen, da sonst die Verbrennung weniger leicht erfolgen dürfte.

Da Essigsäure nicht angegriffen wird, können alle möglichen mit Bleiacetaten fällbare Körper bestimmt werden, sei es, daß man den Chromsäureverbrauch vor und nach der Ausfällung bestimmt oder daß man die Bleisalze mit Schwefelsäure zersetzt und die Lösung in Reaktion bringt.

Ferner ließe sich etwa bei auf biologischem Wege entstandenen flüchtigen Säuren rasch feststellen, ob Essigsäure vorliegt bzw. ob sie einen wesentlichen Teil der Säuren ausmacht.

Nächstens hoffe ich über Anwendungen der Methode in der Fettanalyse berichten zu können.

Zusammenfassung.

Die Verbrennungsmethode organischer Verbindungen mit Bichromat und Schwefelsäure, welche der *Bangschen* Mikrofettbestimmung zugrunde liegt, wurde auf eine Reihe von Verbindungen angewendet. Es werden Vorschläge gemacht, die Methode in der Lebensmittelchemie und Biochemie da und dort anzuwenden.

Die Rolle der Lunge im intermediären Stickstoffwechsel.

I. Mitteilung:

Der Gehalt an Gesamt- und Reststickstoff im rechten Herzen und im arteriellen Blute in der Norm und nach intravenöser Seruminjektion.

Von

A. M. Tscharny (Charkow).

[Aus dem Laboratorium für pathologische Physiologie des Medizinischen Instituts zu Charkow (Ukraine).]

(Eingegangen am 9. Juli 1927.)

Nach der allgemein herrschenden Ansicht findet in der Lunge der Gaswechsel statt.

In den Arbeiten von *Krogh*, *Pflüger*, *Bohr*, *Zuntz* und *Löwy* sind die Fragen nach dem Wesen dieses Gaswechsels, nach dem Vorhandensein einer „Gasdrüse“ mit sekretorischen Funktionen, sowie nach dem Vorherrschen von Diffusionsprozessen in sorgfältiger Weise experimentell bearbeitet worden.

Infolge der Bedeutung dieser Probleme ist jedoch ein anderer Gegenstand außer acht gelassen worden: Die Möglichkeit einer Metamorphose von verschiedenen organischen Stoffen in den Lungen.

In manchen Abhandlungen findet sich ein Hinweis darauf, daß die Lunge auch im Metabolismus eine gewisse Rolle spielt. So zeigte seinerzeit *Schmiedeberg*, daß das mit Benzylester und Salicylaldehyd vermischte Blut bei der Durchströmung der isolierten Lunge die Bildung von Benzoesäure hervorruft. Am eingehendsten ist die Anteilnahme der Lunge bei der Speicherung oder Verarbeitung von Fetten oder Lipoiden aufgeklärt worden.

Die experimentellen und histologischen Untersuchungen von *Roger* und *Binet* ergaben, daß die Lunge an der Speicherung sowie an der Verarbeitung der Fette beteiligt ist (lipopektische und lipodiätetische Lungenfunktion). *Abelous* und *Soula* betonen die Mitwirkung der Lunge an der Cholesterinretention. Die Gegenwart von Glycerophosphatase weist auf die Möglichkeit einer Lecithinspaltung in der Lunge hin (*Müller*). Schließlich zeigen die Forschungen von *S. Leites* über den Fett- und Lipoidstoffwechsel die Möglichkeit einer Lecithin- und Cholesterinspaltung in der Lunge. Die verhältnismäßig große Anzahl von Arbeiten über die Beteiligung der Lunge am Fettmetabolismus ist wahrscheinlich durch „die besonderen anatomischen Verbindungen zwischen der Lunge und den Verdauungs-

prozessen“ (*Roger*) hervorgerufen worden: Die Kohlehydrate und Eiweißabbauprodukte gelangen vorerst in die Leber, während die Lunge die erste Etappe bildet, zu der die Fette, Lipoide bzw. ihre Spaltungsprodukte gelangen. Die qualitative Analyse des venösen und arteriellen Blutstickstoffs gestattet es andererseits, die Bedeutung der Lungen im organischen Stoffwechsel festzustellen. Aus den Befunden von *Bogendorfer* und *Nonnenbruch* ging hervor, daß das venöse Menschenblut in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle mehr Erythrocyten und Gesamteiweiß enthält als das arterielle. *Böhme* und *Schwenker*, sowie *Brunetti* und *Elek* weisen gleichfalls auf den erhöhten Eiweißgehalt des venösen Blutes im Vergleich zu dem des arteriellen hin; die letztgenannten Autoren finden jedoch keinen Unterschied im Reststickstoffgehalt des venösen und arteriellen Blutes. *Häbler* konnte andererseits eine konstante Zunahme des Reststickstoffs im venösen Blute im Vergleich zum arteriellen Blute feststellen. Da nun das arterielle Blut bekanntlich mehr Chloride enthält, die Ergebnisse dieser Autoren aber nicht auf den Trockenrückstand bezogen angeführt wurden, so bleibt diese Frage im allgemeinen noch ungeklärt.

Die erwähnten Angaben veranlassen uns, die mit der Lunge verbundenen Stickstoffwechselprozesse, sowie den Zusammenhang zwischen Stickstoffwechsel und den am Endmetabolismus teilnehmenden Organen zu erforschen.

Eine der üblichen Methoden, die das Studium der angeschnittenen Fragen ermöglicht, ist die Bestimmung des Stickstoffs im Blute des rechten Herzens und der Arterie, d. h. im zu- und abfließenden Blute der Lunge.

In dieser Richtung führten wir 17 Versuche aus.

Methodik.

Die Stickstoffbestimmung erfolgte bei den Versuchstieren (Hunden) auf Grund der *Bangschen* Mikromethode mittels acidimetrischer Titration nach *Pregl* im Blute des rechten Herzens und der Arteria femoralis. Das unmittelbar in die Lunge eintretende Blut stammt vom rechten Herzen, während das abfließende Blut das arterielle ist. Nach Freilegung der Arteria femoralis des auf dem Operationstisch festgebundenen Hundes wurde mit Hilfe einer langen, dünnen Nadel, die in den dritten Zwischenrippenraum längs der Linea parasternalis dextra eingeführt war, Blut entnommen.

Als Beweis, daß gerade das rechte Herz getroffen wurde, dienten die mit den Nadelschwankungen synchronischen Herzoszillationen, sowie das Auftreten des venösen Blutes in der Nadel. Es muß betont werden, daß wir an den Herzen der Hunde, denen mehrmals Blut entnommen wurde, keine pathologischen Veränderungen beobachten konnten. Fast gleichzeitig mit der Blutentnahme aus dem rechten Herzen erfolgte auch diejenige aus der Arteria femoralis.

Bei der Seruminjektion ins Blut wurde die Methodik etwas abgeändert: Nach der Blutentnahme aus dem rechten Herzen und der Arterie zur Feststellung der Norm wurden in die Vena jugularis 5 ccm Pferdeserum eingeführt, wobei gleichzeitig mit der Einführung in die Vena jugularis und im Verlauf der Injektion Blut aus der Arteria femoralis entnommen wurde.

5 Minuten später wurde das Blut wieder aus dem rechten Herzen und der Arteria femoralis entnommen. Um den Einfluß der Versuchstechnik auf das Verhalten des Stickstoffs zu ermitteln, haben wir einen Kontrollversuch mit Einführung von *Ringer-Lockescher* Flüssigkeit ausgeführt.

Versuch XII.

	Rechtes Herz		Arteria femoralis	
	Rest-N in mg.‰	Gesamt-N in ‰	Rest-N in mg.‰	Gesamt-N in ‰
Norm.	45,4 (204)	3,0 (15,7)	41,4 (196)	3,0 (15,3)
Während der Injektion von 10 cem Flüssigkeit	—	—	41,4 (196)	2,97 (15,0)
Fünf Minuten nach der Ein- führung	44,0 (210)	3,17 (15,7)	39,7 (186)	3,18 (14,5)

Die in Klammern angeführten Zahlen entsprechen dem Prozentgehalt an trockenem Rückstand.)

Die Versuchsanordnung an und für sich ruft, wie ersichtlich, keine Veränderungen im Verhalten der Stickstoffprodukte des Blutes hervor.

Die Ergebnisse unserer Versuche in bezug auf den normalen Gehalt an N-Stoffen in dem von der Lunge zu- und abfließenden Blute sind in der Tabelle I angeführt.

Tabelle I.

Nr. der Hunde	Rechtes Herz			Arteria femoralis			Zunahme oder Ab- nahme d. Rest-N im Blute ‰	Bemerkung
	Rest-N in mg.‰	Ge- samt-N in ‰	Rest-N in ‰ Ge- samt-N	Rest-N in mg.‰	Ge- samt-N in ‰	Rest-N in ‰ Ge- samt-N		
1	43,3 (184)	2,29 (12,1)	1,89 1,52	36,7 (158)	2,30 (9,97)	1,60 1,68	+ 18,0 + 16,4	
2	44,9 (207)	2,77 (13,4)	1,62 1,54	41,4 (188)	2,60 (12,7)	1,60 1,48	+ 8,4 + 10,1	
3	43,4 (181)	2,61 (10,7)	1,66 1,69	52,8 (240)	3,05 (11,7)	1,73 1,79	— 17,8 — 13,8	Der Versuch Nr. 3 wurde wiederholt und ergab dieselben Resultate.
4	47,4 (238)	2,84 (12,7)	1,67 1,86	41,0 (192)	2,45 (11,0)	1,66 1,74	+ 15,6 + 24,0	
5	48,0 (240,0)	2,50 (11,0)	1,92 2,18	40,5 (199)	2,40 (10,8)	1,69 1,76	+ 18,5 + 26,3	
6	37,0 —	3,16 —	1,17 —	35,0 —	2,65 —	1,32 —	+ 6,7 —	
7	44,0 (198)	3,0 (12,9)	1,46 1,53	41,6 (187)	3,0 (13,1)	1,38 1,42	+ 5,7 + 5,8	
8	37,3 (206)	2,31 (13,2)	1,61 1,56	46,4 (240)	2,35 12,1	1,97 2,0	— 19,6 — 18,3	
9	43,1 —	2,65 —	1,62 —	38,4 —	2,58 —	1,48 —	+ 12,0 —	
10	50,0 (236)	2,45 (10,9)	2,04 2,17	41,0 (192)	2,16 (9,24)	1,90 2,07	+ 21,9 + 22,5	
11	54,0 (218)	2,66 (10,8)	2,03 2,01	40,8 (172)	2,40 (9,9)	1,70 1,72	+ 32,3 + 26,7	

(Die Zahlen in Klammern zeigen den Prozentgehalt des trockenen Rückstandes an.)

Wie sich aus den angeführten Daten ergibt, zeigen von elf Versuchen neun ein übereinstimmendes Verhalten. Der Gehalt an Gesamt-N im Blute des rechten Herzens unterscheidet sich nur wenig vom arteriellen; die Berechnung auf den Trockenrückstand ergab in einigen Versuchen eine Gesamt-N-Steigerung im venösen Blute, in anderen im arteriellen Blute. Die meisten Experimente gestatten jedoch, eine Tendenz zur Zunahme des Gesamt-N im Blute des rechten Herzens festzustellen.

Andererseits ist die Steigerung des Rest-N im venösen Blute ziemlich stark ausgedrückt. Mit Ausnahme von zwei Fällen kann man eine konstante Zunahme des Rest-N im venösen Blute beobachten.

Tabelle II.

Nr. der Hunde		Rechtes Herz		Arteria femoralis	
		Rest-N in mg-%	Gesamt-N in %	Rest-N in mg-%	Gesamt-N in %
13	Norm	41,0	2,61	37,6	2,58
	Während der Injektion von Pferdeserum	—	—	38,0	2,30
	5 Minuten nach der Ein- führung	60,5	2,64	42,4	2,47
14	Norm	37,0	3,0	36,0	2,70
	Während der Injektion . .	—	—	37,0	2,64
	5 Minuten nach der Ein- führung	68,0	3,16	41,5	3,0
15	Norm	44,4 (186)	2,69 (11,0)	40,9 (166)	2,42 (10,9)
	Während der Injektion . .	—	—	38,2 (165)	2,64 (11,0)
	5 Minuten nach der Ein- führung	54 (228)	2,83 (11,7)	42,0 (175)	2,64 (11,07)
16	Norm	43,2	2,44	37,9	2,32
	Während der Injektion . .	—	—	38,0	2,40
	5 Minuten nach der Ein- führung	48,6	2,56	34,6	2,18
17	Norm	42,6 (220)	2,37 (12,3)	42,5 (210)	2,17 (12,0)
	Während der Injektion von 5 cem Hundeserum . .	—	—	41,5 (213)	2,25 (12,0)
	5 Minuten nach der Ein- führung	41,7 (223)	2,31 (11,7)	41,0 (220)	2,10 (11,0)
18	Norm	38,3	2,69	36,0	2,58
	Während der Injektion von Pferdeserum	—	—	36,0	2,63
	5 Minuten nach der Ein- führung	44,6	2,69	40,7	2,56

Im allgemeinen variiert der Reststickstoffgehalt im Hundeblut in der Norm von 37 bis 48 mg-%. Es muß jedoch betont werden, daß die Resultate nicht ganz eindeutig sind; so haben wir in einzelnen Versuchen (Hund Nr. 3 und 8) entgegengesetzte Ergebnisse erhalten, d. h. mehr Reststickstoffprodukte in der Arterie als in der Vene. Die Zahlen der beiden letzten Versuche, 50 und 57 mg-% im rechten Herzen, sind gleichfalls nicht ganz befriedigend. Obgleich noch höhere Werte für Reststickstoff im peripheren Venenblute von Hunden angeführt werden (im Durchschnitt 71 mg-% nach Häbler), haben wir im Verlauf unserer weiteren Arbeit an einem großen experimentellen Material niemals solche Befunde erheben können. Wir vermögen nur festzustellen, daß das der Lunge zufließende Blut in der Norm mehr Reststickstoff enthält als das abfließende; unter gewissen Bedingungen kann diese Steigerung sehr bedeutend sein. Es stellte sich daher die Notwendigkeit ein, eine künstliche Azotämie im Blute hervorzurufen, um die Mitwirkung der Lunge an der Retention der intermediären N-Stoffwechselprodukte leichter zu ermitteln. Zu diesem Zwecke wurde den Hunden Pferdeserum in die Vena jugularis injiziert. Tabelle II zeigt die erhaltenen Ergebnisse an sechs Tieren.

Wie ersichtlich, lieferte die Einführung von Pferdeserum folgende Resultate: Der Reststickstoffgehalt der Arterie ist im Augenblick der Seruminjektion entweder unverändert oder sogar etwas erniedrigt. 5 Minuten später aber finden bereits neue Wechselbeziehungen im Blute statt. Die nach parenteraler Seruminjektion auftretende Azotämie gestattet, eine mehr ausgeprägte, stickstoffspeichernde Funktion der Lunge festzustellen; es kann hierbei eine bedeutende Zunahme des Rest-N im Blute des rechten Herzens (28 bis 63 mg-%) in verschiedenen Versuchen stattfinden, während die Menge des Gesamt-N fast unverändert bleibt.

Wir können somit konstatieren, daß nach der Injektion von heterogenem Serum Bedingungen für das Auftreten einer erhöhten Reststickstoffmenge im Venenblut geschaffen werden. Diese Stickstoffprodukte können während der ersten 5 Minuten das Lungenfiltrationssystem nicht passieren. Am Morgen bleibt bei demselben Tiere die Menge des Rest-N im Blute des rechten Herzens und der Art. femoralis wie in der Norm unverändert.

Auf Grund der angeführten Tatsachen lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Im arteriellen, von der Lunge abfließenden Blute von Hunden läßt sich in der Norm nunmehr eine mehr oder weniger ausgeprägte Abnahme des Rest-N im Vergleich mit dem der Lunge zufließenden Blute des rechten Herzens feststellen.

2. Diese Abnahme des Rest-N im arteriellen Blute im Vergleich mit dem Blute des rechten Herzens tritt noch deutlicher hervor nach der durch Heterogen-Seruminjektion hervorgerufenen Zunahme des Rest-N im rechten Herzen.

3. Es muß betont werden, daß der Gesamt-N im arteriellen Blute, im Vergleich mit dem rechten Herzen, eine gewisse Tendenz zur Abnahme besitzt.

4. Die angeführten Befunde berechtigen zu dem Schluß, daß in der Lunge eine Retention von N-Stoffen aus der Gruppe des Reststickstoffs stattfindet.

Ich halte es für meine Pflicht, Herrn Dr. *S. Leites* für seine Hilfe bei dieser Arbeit meinen innigsten Dank auszusprechen.

Literatur.

1) Handb. d. norm. u. pathol. Physiol., herausg. von *Bergmann, Bethe* u. a. — 2) *Roger*, Questions actuelles de Biologie médicale 1922. — 3) *Abelous* und *Soula*, C. r. d. soc. biol. **88**, 1920. — 4) *H. Roger* und *L. Binet*, Les annales de physiologie **1**, Nr. 3, 1926. — 5) *Brunetti* und *Elck*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **47**, H. 3/4, 1926. — 6) *C. Häbler*, ebendasselbst **54**, H. 3/4, 1927. — 7) *S. Leites*, diese Zeitschr. **184**, 114 bis 116, 1927.

Die Rolle der Lunge im intermediären Stickstoffwechsel.

II. Mitteilung:

Reststickstoffgehalt des von der isolierten Lunge ab- und zufließenden defibrinierten Blutes.

Von

A. Tscharny und S. Krassowitzkaja (Charkow).

[Aus dem Laboratorium für pathologische Physiologie des Medizinischen Instituts zu Charkow (Ukraine).]

(Eingegangen am 9. Juli 1927.)

In der vorhergehenden Mitteilung hat der eine von uns (A. Tscharny) nachgewiesen, daß das Blut des rechten Herzens bedeutend mehr N-Stoffe aus der Gruppe des Reststickstoffs enthält als die Arterie. Diese Substanzen werden im Lungensystem angehäuft, woraus man auf die stickstoffspeichernde Funktion der Lunge schließen konnte. Die weitere Aufgabe bestand nun in der Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse *in vivo*, an der isolierten Lunge, nur waren gewisse Momente, die *in vivo* die speichernde Funktion der Lunge hätten beeinflussen können, auszuschließen. Zu diesem Zwecke haben wir fünf Versuche an isolierten Hundelungen ausgeführt. Die Methodik war wie folgt:

Entblutung des Hundes durch die Arteria und Vena femoralis. Defibrinierung des Blutes und Filtration, um das Gerinnsel abzutrennen. Darauf Isolierung des Herz-Lungensystems. Verbindung einer mit dem *Mariott*schen System zusammenhängenden Kanüle mit der Arteria pulmonalis. Die andere, bedeutend weitere Kanüle wurde in den rechten Vorhof eingeführt und an der Mündung der Lungenvenen befestigt. Das Herzpräparat wurde alsdann herausgenommen und in den Brutschrank bei 38 bis 39° gebracht. Die Lunge wurde ein- bis zweimal vermittelst Spritze durchgespült, um das Blutgerinnsel zu entfernen. Das *Mariott*sche Gefäß wurde mit defibriniertem Blute desselben Hundes gefüllt und das Blut bei geringem Öffnen des Ventils langsam durch die Lunge hindurchgelassen. Im ab- und zufließenden defibrinierten Blute wurde der Reststickstoffgehalt nach *Acél* bestimmt.

Jede Zahl stellt das Mittel aus zwei Kontrollproben dar, deren Unterschied in der Kolorimerteilung im Maximum $\pm 0,5$ betrug. Die Ergebnisse unserer Versuche finden sich in den folgenden Protokollen.

Protokoll I.

Entblutung des Hundes. Blutdefibrinierung. Die Lunge zweimal durch Spritze mit *Ringer-Lockescher* Flüssigkeit durchgespült.

12 ^b	Defibriertes Blut durchgelassen		
12	der Gehalt an Rest-N in dem den Lungen zufließenden defibrierten Blute beträgt		
			40 mg-%
12 18'	die I. Portion des abfließenden Blutes. Reststickstoffgehalt		
			16 "
12 53'	II. Portion, Reststickstoffgehalt		
			21 "
2	III.	"	38 "
2 30'	IV.	"	27 "
3	V.	"	35 "

Protokoll II.

Entblutung des Hundes. Defibrinierung des Blutes. Die Lunge zweimal mit Hilfe einer Spritze mit *Ringer-Lockescher* Flüssigkeit durchgespült.

11 ^b	Defibriertes Blut durchgelassen		
11	der Gehalt an Rest-N in dem den Lungen zufließenden defibrierten Blute		
			41,4 mg-%
11 15'	die I. Portion des abfließenden Blutes, Rest-N-Gehalt		
			26,0 "
11 30'	II. Portion, Rest-N-Gehalt		
			37,5 "
11 50'	III.	"	33,5 "
12 30'	IV.	"	28,5 "
1 30'	V.	"	28,5 "
2	VI.	"	33,3 "
1 30'	Kontrolle des zufließenden Blutes, Rest-N-Gehalt		
			40,5 "

Protokoll III.

Entblutung des Hundes. Defibrinierung des Blutes. Die Lunge nicht durchgespült.

11 ^b 50'	Defibriertes Blut durchgelassen.		
11 50'	der Gehalt an Rest-N in dem den Lungen zufließenden Blute		
			42,4 mg-%
12 20'	die I. Portion des abfließenden Blutes, Rest-N-Gehalt		
			37,0 "
12 50'	II. Portion, Rest-N-Gehalt		
			31,5 "
1 20'	III.	"	27,0 "
1 40'	IV.	"	28,0 "
2 20'	V.	"	35,0 "

Protokoll IV.

Entblutung des Hundes. Defibrinierung des Blutes. Die Lunge zweimal
vermittelt Spritze mit Flüssigkeit durchgespült.

10 ^b	Defibriertes Blut durchgelassen.		
10	der Gehalt an Rest-N in dem der Lunge zufließenden Blute		
			41,3 mg-%
10 30'	die I. Portion des abfließenden Blutes, Rest-N-Gehalt		
			29,6 "
11 10'	II. Portion, Rest-N-Gehalt		
			27,5 "
11 30'	III. " "		
			25,0 "
12	IV. " "		
			35,0 "
12 30'	V. " "		
			40,0 "
1	VI. " "		
			40,0 "
11 30'	Kontrolle des zufließenden Blutes, Rest-N-Gehalt . .		
			41,3 "

Protokoll V.

Entblutung des Hundes. Defibrinierung des Blutes. Die Lunge nicht
durchgespült.

12 ^b 30'	Defibriertes Blut durchgelassen.		
12 30	der Gehalt an Rest-N in dem der Lunge zufließenden Blute		
			40,5 mg-%
1	die I. Portion des abfließenden Blutes, Rest-N-Gehalt		
			28,5 "
2	II. Portion, Rest-N-Gehalt		
			33,3 "
2 30'	III. " "		
			30,0 "
3	IV. " "		
			25,0 "
3 30'	V. " "		
			32,4 "
3	Kontrolle des zufließenden Blutes, Rest-N-Gehalt . . .		
			40,0 "

Bei der Betrachtung der an isolierten Lungen erhaltenen Ergebnisse
ist folgendes festzustellen:

In allen Versuchen ist der Gehalt an Rest-N im abfließenden Blute
immer geringer als im zufließenden beim Passieren des defibrierten Blutes
des Tieres durch seine isolierte Lunge.

Diese Abnahme läßt sich ziemlich lange, während einiger Stunden,
beobachten und hängt nicht davon ab, ob die Lunge vor dem Versuch
durchgespült wurde oder nicht. Die Erniedrigung des Rest-N im ab-
fließenden Blute hängt auch nicht mit den im zufließenden Blute statt-
findenden Veränderungen zusammen, denn Kontrollversuche ergaben bei
qualitativer Bestimmung im zufließenden Blute ähnliche Zahlen wie am
Anfang des Versuchs.

Auf Grund des oben Gesagten kann man schließen, daß die N-
Stoffe bei ihrem Durchgang durch die Lungen immer angehäuft werden,
worin eine Bestätigung der stickstoffspeichernden Funktion der
Lunge zu erblicken ist.

Über die Wirkung großer Mengen Eisens.

I. Mitteilung:

Über die Wirkung des Eisens auf die Knochenentwicklung.

Von

K. Waltner.

(Aus der Kinderabteilung des Johns-Hopkins-Hospital Baltimore und der ungarischen Universitäts-Kinderklinik Szeged.)

(Eingegangen am 11. Juli 1927.)

Rachitisähnliche Knochenveränderungen wurden experimentell — wie bekannt — bisher auf folgenden Wegen hervorgerufen: Durch Diäten mit ungenügendem Phosphor- und überreichlichem Kalkgehalt, durch Diäten mit genügendem Phosphor- aber ungenügendem Kalkgehalt, durch Thalliumverfütterung, durch Strontiumverfütterung. Die infolge eines Phosphor- oder Kalkmangels entstehenden Kalzifikationsstörungen können auf denselben Wegen beeinflußt werden, wie die menschliche Rachitis: mit Vitamin D (bestrahltes Ergosterin) oder mit vitamin-D-haltigen Substanzen, wie Lebertran, Eigelb, mit ultravioletten Strahlen (Sonnenbestrahlung, Quarzlampebestrahlung). Die sogenannte Strontiumrachitis ist durch Lebertran nicht einflußbar. Ob die durch Thalliumvergiftung hervorgerufenen Knochenveränderungen mit anti-rachitisch wirkenden Substanzen ansprechbar sind oder nicht, darüber fehlen noch experimentelle Erfahrungen.

Wir möchten im folgenden über einen neuen Weg zur Erzeugung einer experimentellen Rachitis berichten. Rachitisähnliche Knochenveränderungen können an Albino-Ratten und Kaninchen auch so hervorgerufen werden, daß man an die Versuchstiere, die mit einer nicht rachitogenen Diät ernährt werden, große Mengen von Eisen verfüttert.

Ein Monat alte Ratten wurden entwöhnt; zu der *McCollumschen* Stockdiät wurden 2% Ferrum reductum gemischt und die Tiere auf dieses Gemisch gesetzt.

Die *McCollumsche* Stockdiät besteht aus 25% Weizen, 25% Mais, 29,5% Hafer, 10% Leinsamenkuchen, 10% Casein, 0,5% CaCO_3 . Sie

enthält eine entsprechende Menge von Phosphor, ihr Kalkgehalt ist zwar niedrig, reicht aber zu einem ungestörten Längenwachstum und zu einer als normal zu betrachtenden Knochenentwicklung aus. Ihr Vitamin-A-Gehalt genügt dazu, die Tiere vor Xerophthalmie zu schützen. Das Nahrungsmisch wird in verschiedenen Laboratorien zur Fütterung der Bruttiere benutzt.

Wenn dieser Diät 2 % reduziertes Eisen beigemischt werden, zeigen die damit ernährten Tiere nach Ablauf von etwa 4 Wochen ausgesprochene rachitische Knochenveränderungen.

Wir unterscheiden nach *P. G. Shipley* zwei Typen der experimentellen Rachitis: die infolge eines Phosphormangels der Diät entstehende Rachitis und die infolge eines Kalkmangels der Diät entstehende Rachitis. Beide Formen sind von charakteristischen blutchemischen Veränderungen begleitet. Die durch Phosphorentziehung hervorgerufene ist mit einem niedrigen anorganischen Phosphorgehalt und einem normalen Kalkgehalt des Serums vergesellschaftet. Die durch Kalkentziehung erzeugte Rachitis ist durch einen niedrigen Serumkalkgehalt und einen normalen Serumphosphorgehalt charakterisiert. Das erstere blutchemische Bild ist in der menschlichen Pathologie für Rachitis, das letztere für Tetanie kennzeichnend. Die durch Stockdiät + 2 % Ferrum reductum hervorgerufene Rachitis ist von einem niedrigen Serumphosphatgehalt begleitet. Der Serumkalkgehalt entspricht jenen Werten, die Tiere mit der Stockdiät ohne Eisenzugabe ernährt zeigen. Auch das histologische Bild ist jenem entsprechend, welches wir bei der durch Phosphorentziehung erzeugten Rachitis vorfinden.

Die *Eisenrachitis* konnte auch an *Kaninchen* erzeugt werden, und auch diese Tiere zeigen die die menschliche Rachitis kennzeichnenden Veränderungen des Blutchemismus, das heißt erniedrigte Phosphor- und unveränderte Kalkwerte.

Bei der Registration dieser Versuchsergebnisse entstanden vor allem folgende drei Fragen: 1. Wird die Eisenrachitis einfach dadurch verursacht, daß das Eisen im Darmkanal der Versuchstiere Phosphor bindet und dadurch die Diät, die ursprünglich eine entsprechende Menge von Phosphor enthalten hat, zu einer phosphordefizienten wird? 2. Kann die Eisenrachitis auch durch Verfütterung von Eisensalzen hervorgerufen werden? 3. Was für eine Wirkung entfaltet reduziertes Eisen, wenn es einer phosphor- bzw. kalkarmen Diät beigemischt wird?

Die Versuche, die auf diese Fragen antworten sollen, sind in die folgende Tabelle gruppiert. Die Resultate zeigen, daß, wenn eine mit 2 % Ferrum reductum etwa äquivalente Menge von Ferrophosphat $[\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2]$ zu der Stockdiät gemischt wird, so entwickeln die Versuchs-

Diät	Gefüttert Tage	Gewicht		Knochenbefund	Ca	P	
		am Beginn g	am Ende g				
Stock + 6% Fe ₃ (PO ₄) ₂	29	65	99	ausgesprochene Rachitis	4,5	7,5	
		45	66	"			
		54	67	milde Rachitis "			
		44	55	keine "			
Stock + 7% FePO ₄	11	57	52	beginnende Rachitis	—	4,8	
	11	42	32	"			
	18	120	106	milde Osteoporose			
	29	55	45	keine Rachitis			
	29	56	55	" — "			
	2	46	—				
Stock + 9% FeC ₆ H ₅ O ₇	21	72	88	schwere Rachitis	—	7,9	
	48	65	beginnende Heilung				
	57	75	schwere Rachitis	—			3,9
	53	77					
Phosphor- defizient + 2% Fe red.	16	61	79	beginnende Rachitis	13,5	3,3	
	31	67	87				
		56	82				
		59	95	sehr schwere "			
	62	88					
Kalk- defizient + 2% Fe red.	21	63	56	ausgesprochene Rachitis	5,3	7,4	
		58	53				
		77	68				
		57	57				

tiere nach Ablauf von etwa 4 Wochen rachitische Veränderungen. Die entstehenden blutchemischen Veränderungen entsprechen denjenigen, die an solchen Tieren festzustellen sind, deren Futter eine ausreichende Menge von Phosphorsalzen enthält, aber defizient an Kalk ist. Ferriphosphat $[\text{FePO}_4]$ hat eine ausgesprochene Giftwirkung: Die Tiere gingen zum Teil vor der Beendigung des Versuches zugrunde, und zwar, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, ein Tier nach zweitägiger Ferriphosphatfütterung und zwei am 11. Tage des Versuches. Keines der Tiere zeigte während der Versuchsdauer eine Gewichtszunahme, und so fehlten auch ausgesprochene rachitische Veränderungen der Knochen. Die Zugabe von zitronensaurem Eisen $[\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7]$ zur Stockdiät wirkt ausgesprochen rachitogen. Die Tiere zeigten nach 3 Wochen schwere rachitische Knochenveränderungen. Der blutchemische Befund war jenem entsprechend, welchen wir bei Tieren vorfinden, die phosphordefizient ernährt wurden.

Werden einer in sich schon rachitogenen Diät 2 % Ferrum reductum beigemischt, so entwickeln die Tiere vielleicht noch schwerere Knochenveränderungen, als die Diät selbst, ohne Zugabe von Eisen, hervorruft. Wir benutzten bei diesen Versuchen zum Teil die bekannte

McCollumsche Diät Nr. 3143, zum Teil ein einfacheres und bedeutend billigeres phosphordefizientes Gemisch, das sich zur Erzeugung einer experimentellen Rachitis in unserem Laboratorium gut bewährt hat und dessen Zusammensetzung folgende ist: 32 % Weizen, 64 % Mais, 1 % NaCl, 3 % CaCO_3 . Die Serumphosphat- und Serumkalkwerte verraten keinen auffallenden Einfluß des Eisens. Vielleicht sinkt der anorganische Phosphorgehalt auf noch etwas niedrigeres Niveau.

Mischt man zu einer kalkdefizienten Diät 2 % reduziertes Eisen, so entwickeln die Versuchstiere eine ausgesprochenere Rachitis, als Tiere mit derselben Diät, aber ohne Zugabe von Eisen ernährt gewöhnlich zeigen. Die blutchemischen Veränderungen sind in beiden Fällen die gleichen.

Als kalkdefiziente Diät wurde zum Teil folgendes Gemisch verwendet: 31 % Weizen, 33 % Mais, 10 % Hafer, 10 % Reis, 15 % Casein, 1 % NaCl. (Diese Zusammensetzung wurde uns von Frau Prof. *Nina Simmonds* empfohlen, für welche Liebenswürdigkeit auch hier gedankt sein soll.) Zum Teil wurde ein in unserem Laboratorium mit entsprechendem Erfolg gebräuchliches, einfacheres Gemisch von folgender Zusammensetzung benutzt: 33 % Weizen, 65.5 % Mais, 1 % NaCl, 0.5 % NaH_2PO_4 .

Auf die Einwirkung von reduziertem Eisen und anorganischen und organischen Eisensalzen entwickeln also Ratten und Kaninchen rachitisähnliche Knochenveränderungen. Bezüglich des Wirkungsmechanismus des Metalls soll folgende Vorstellung angedeutet werden. Eisen in therapeutischen Dosen angewendet, ist eins der wirksamsten Mittel in der Bekämpfung von verschiedenen Anämien. „Die Wirkung des Eisens beruht, wie ich heute beweisen kann, auf einer Reizwirkung auf die Erythropoese des Knochenmarkes“, sagt *Naegeli*, und auch *Asher* hat dieselbe Anschauung geäußert. Die Experimente von *Bosányi* sprechen dafür, daß der Verlauf der Ossifikation bzw. Kalzifikation von einer Funktion des Knochenmarks abhängig ist. Er extrahierte aus dem normalen Knochenmark eine anti-rachitisch wirkende Substanz, welche im rachitischen Knochen nicht vorhanden ist. Er spricht von einer der pathologischen Knochenveränderung zugrunde liegenden Dysfunktion des Knochenmarks bei Rachitis. Als eine weitere Stütze seiner Anschauung beruft er sich auf die die Rachitis gewöhnlich begleitende Anämie, gleichfalls ein Ausdruck des Gestörtseins der Knochenmarkfunktion.

Vielleicht entfalten die in unseren Experimenten angewendeten hohen Eisendosen eine schädigende Wirkung auf das Knochenmark der Versuchstiere, und die rachitischen Knochenveränderungen sind auf eine Funktionsstörung des Marks zurückzuführen.

Zusammenfassung.

Eine in sich nicht rachitogene Diät bewirkt nach Zusatz von 2 % *Ferrum reductum* die Entwicklung rachitischer Knochenveränderungen. *Ferrophosphat* in äquivalenter Menge hat den gleichen Effekt. *Ferri-*

phosphat entfaltet eine Giftwirkung, die die Entstehung einer Rachitis schon in sich unmöglich macht. Ferrum citricum (in einem äquivalenten Prozent) verleiht der Diät gleichfalls eine rachitogene Eigenschaft. 2% reduziertes Eisen, zu einer phosphordefizienten, stark rachitogenen Diät gemischt, beeinflußt die rachitisproduzierende Eigenschaft der Diät — wenn überhaupt, so — im Sinne einer Steigerung dieser Eigenschaft. Zu einer kalkdefizienten Diät gemischt, steigert hingegen das Eisen ausgesprochen die rachitogene Wirkung der Diät.

Prof. *P. G. Shipley*, der mit seinem Interesse und seinem Rat diese Arbeit freundlich unterstützte, danken wir auch bei dieser Gelegenheit herzlichst.

Zur Kenntnis der Takadiastase.

Von

K. Nishikawa.

(Aus der chemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses in Berlin.)

(Eingegangen am 12. Juli 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Takadiastase ist wegen ihrer starken Fermentwirkung und ihres Fermentreichtums schon vielfach Gegenstand der Forschung gewesen, und besonders in den letzten Jahren war man darauf bedacht, festzustellen, ob neben den bisher bekannt gewordenen Fermenten, wie Diastase und Trypsin, sich nicht noch andere in ihr feststellen ließen. So hat *Wohlgemuth*¹ gezeigt, daß sich in ihr außerdem noch Erepsin, peptolytisches Ferment, Labferment, Lipase, Lecithinase und Adrenalinase findet. Ferner gelang *Neuberg* und seinen Mitarbeitern² der Nachweis von Phosphatase, Sulfatase, β -Glucosidase, Cellase, Inulase, Nuclease, Lactase, sowie die Spaltung der Phenacetursäure und des Benzoylglykokolls.

Über die Wirkungsbedingungen dieser Fermente ist aber noch sehr wenig oder gar nichts bekannt. Und doch mußte es von großem Interesse sein, festzustellen, ob z. B. die Hauptrepräsentanten Trypsin und Diastase bei der gleichen Reaktion ihre optimale Wirkung zeigen, oder ob sich hier grundlegende Unterschiede ergeben. Zugleich legte das Vorhandensein von so vielen Fermenten in der Takadiastase den Gedanken nahe, daß sich vielleicht noch andere, bisher nicht erkannte Wirkungen mit der Takadiastase erzielen lassen würden. Deshalb

¹ *J. Wohlgemuth*, diese Zeitschr. **89**, 324, 1912.

² *C. Neuberg* und Mitarbeiter, ebendaselbst **142**, 184, 1923; **148**, 190, 399, 1923; **144**, 199, 1924; **145**, 186, 1924; **147**, 255, 370, 373, 1924; **151**, 335 und 498, 1924.

bin ich gern der Anregung von Herrn Prof. *Wohlgemuth* gefolgt und habe die Takadiastase nach den oben angedeuteten Richtungen hin mit seiner Unterstützung untersucht.

Für meine Untersuchungen standen mir drei Präparate zur Verfügung, ein verhältnismäßig frisches Präparat aus dem Jahre 1925, das dem hiesigen Institut von der Firma Parke, Davis u. Co. in London freundlichst zur Verfügung gestellt war, ein zweites Präparat aus dem Jahre 1922 und ein drittes aus dem Jahre 1910, das seinerzeit Herr *Takamine*, New York, Herrn Prof. *Wohlgemuth* geschickt hatte, und mit dem er seine damaligen Versuche angestellt hatte.

Um ein Urteil über die Haltbarkeit der Präparate zu haben, ermittelte ich in allen dreien den Wert für Amylase und für Trypsin, ersteren nach *Wohlgemuth*, letzteren nach *Gross-Fuld*, und verglich sie mit den Anfangswerten, die früher bei ihrem Eintreffen von Herrn Prof. *Wohlgemuth* festgestellt worden waren. Dabei ergab sich für eine 1%ige Lösung folgendes Resultat:

Präparat	Amylase $D_{39'}^{380}$	Trypsin $D_{30'}^{380}$
I { 1925	80	8
I { 1927	80	8
II { 1922	160	8
II { 1927	160	8
III { 1910	1280	128
III { 1927	1280	128

Hiernach haben sämtliche Präparate ihre Wirkung unverändert beibehalten, und selbst das Präparat III zeigt noch nach 17 Jahren den gleichen Wirkungsgrad wie im frischen Zustande. Letzteres ist bei weitem das wirksamste. 1 g dieses Präparats enthält, wie *Wohlgemuth* festgestellt hat, so viel Diastase wie 100 ccm frischer menschlicher Pankreassaft, der aus einer nach Entfernung einer Pankreaszyste zurückgebliebenen Pankreasfistel geflossen war. Dieses letztere Präparat als das wirksamste diente mir für meine weiteren Untersuchungen.

I.

1. Wirkungsoptimum der Amylase.

Schon *Wohlgemuth* hatte festgestellt, daß die Amylase der Takadiastase gegen anorganische wie organische Säuren lange nicht so empfindlich ist wie z. B. die Speichelamylase. Auch gegenüber Alkalien hatte sie sich ziemlich resistent erwiesen. Es war deshalb zu erwarten, daß das Wirkungsoptimum nicht in einem eng umschriebenen Re-

aktionsbereich liegen würde, wie z. B. bei der Speicheldiastase ($p_H = 6,7$), sondern einen verhältnismäßig großen Bezirk umfassen würde. In der Tat ergab sich, gemessen mit der Methode von *Wohlgemuth*, bei Verwendung von Phosphatpuffern nach der Vorschrift von *Soerensen*, optimale Wirkung im Bereich von $p_H = 6,2$ bis $7,2$, wie aus folgender Kurve ersichtlich ist.

Um jeder Beeinflussung durch etwaige Ionen zu begegnen, die dem Fermentmaterial noch von seiner Herstellung anhaften konnten, wurden die gleichen Versuche mit Takadiastaselösungen angestellt, die

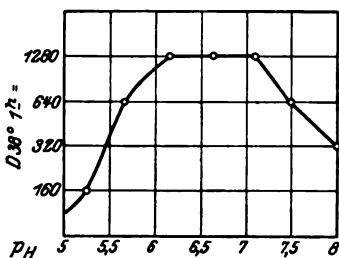


Abb. 1.

vorher einer gründlichen Dialyse unterworfen waren. Zu dem Zwecke stellte ich mir eine 1%ige Lösung her und dialysierte im Pergamentschlauch gegen destilliertes Wasser 48 Stunden lang in Gegenwart von Toluol. Unter Berücksichtigung der Volumenzunahme ergab sich zunächst niemals eine Abschwächung der Fermentwirkung im Gegensatz zur Speicheldiastase, für die *Wohlgemuth* gezeigt hat, daß sie

durch Dialyse ihre Wirkung völlig einbüßt, auf Zusatz von NaCl aber sofort in vollem Umfang reaktiviert wird. Auch bei den so gereinigten Fermentlösungen lag das Wirkungsoptimum zwischen $p_H = 6,2$ und $7,2$.

Dieser Befund steht im Widerspruch mit den Feststellungen von *R. Kuhn*¹, der als Wirkungsoptimum für die Amylase der Takadiastase $p_H = 4,0$ bis $5,0$ gefunden hat. Dieser Widerspruch ist aber nur ein scheinbarer. Denn für die Wirkung ist, abgesehen vom Milieu, nicht allein das Substrat von großer Wichtigkeit, sondern auch der Moment, in dem die Spaltung unterbrochen und gemessen wird. Wir werden weiter unten zeigen, daß es nicht dasselbe ist, ob man bei der Gelatinespaltung die Verflüssigung oder die Säurespaltung mißt. In dem ersten Falle fand sich optimale Wirkung im Bereich von $p_H = 8$ bis 10 , bei Messung der frei gewordenen Säuremengen das Optimum bei $p_H = 7,7$ bis $8,3$. Ganz ähnlich liegen aller Wahrscheinlichkeit nach die Verhältnisse, wenn man in dem einen Falle, wie wir das getan haben, den Abbau der Stärke bis zum Achroodextrin mißt oder, wie *Kuhn* vorgegangen ist, die Gesamtmenge der reduzierenden Substanz als Maßstab für die Wirkung nimmt. Während nach *Kuhn* in letzterem Falle bei $p_H = 4,0$ bis $5,0$ die größte Menge an reduzierender Substanz im Reaktionsgemisch anzutreffen war, haben wir die kräftigste Zer-

¹ *R. Kuhn*, Ann. **448**, 28, 1925.

legung der Stärke bis zum Achroodextrin im Bereich von $p_H = 6,2$ bis $7,2$ beobachtet. Hiernach geht man wohl nicht fehl, wenn man annimmt, daß für die Verflüssigung von Stärkekleister und für die Aufhellung von Stärketrüben sich wieder ein anderes Optimum ergeben wird.

Uns scheint dieser Punkt von prinzipieller Bedeutung, zumal, wie bereits gesagt, wir ganz analoge Verhältnisse bei der Tryptase in bezug auf Gelatinespaltung gefunden haben. Es ist deshalb nicht angängig, wie das bisher in der Literatur und in Lehrbüchern üblich war, für das Wirkungsoptimum eines Ferments nur die Reaktion anzugeben, wie z. B. für Speichelamylase $p_H = 6,7$, sondern man wird in Zukunft stets hinzufügen müssen, was man gemessen hat, bzw. welche Methode man bei der Messung angewandt hat.

2. Wirkungsoptimum für Tryptase.

Die Takadiastase wirkt nicht bloß bei alkalischer Wirkung stark tryptisch, sondern, wie *Wohlgemuth* festgestellt hat, auch bei ausgesprochen saurer Reaktion, so daß es fast den Anschein hatte, als ob sich neben dem Trypsin auch ein pepsinähnliches Ferment in der Takadiastase findet. Wenn das der Fall war, so mußte es gelingen, da Pepsin gegen freies Alkali außerordentlich empfindlich ist, den Pepsinanteil durch Alkali zu vernichten. Dieser erwies sich aber so resistent, daß wohl kaum die Existenz eines Pepsins in der Takadiastase angenommen werden kann. Immerhin zeigen schon diese Versuche, daß der Wirkungsbereich der in der Takadiastase enthaltenen Tryptase ein sehr großer ist.

Wir orientierten uns zunächst mittels der Gelatinemethode von *Fermi*, die bekanntlich eine Reihenmethode ist und auf der Verflüssigung von Chloroformgelatine beruht, in welchem p_H -Bereich die besten Wirkungen zu erwarten waren. Doch verwandten wir wegen der Empfindlichkeit der Fermente nicht Chloroform, sondern benutzten Thymolgelatine, deren saure Wirkung wir mit Alkali so lange abstumpften, bis die Gelatine eine Reaktion von $p_H = 7,0$ zeigte. Als Puffer benutzten wir für den stark sauren Bereich nach *Soerensen* Gemische von sekundärem Natriumcitrat und $n/10$ HCl, für den neutralen bzw. schwach sauren bzw. schwach alkalischen Bereich primäres und sekundäres Phosphat, für den stark alkalischen Bereich Glykokoll und $n/10$ NaOH. Von den orientierenden Versuchen sei nur einer hier angeführt.

Als Fermentlösung benutzte ich eine 0,1 %ige Takadiastaselösung, von einer 5 %igen neutralen Thymolgelatine je 2,0 ccm pro Glas. Versuchsdauer 1 Stunde bei 38°C , danach 15 Minuten bei 0°C .

Ferment- menge	Reaktion $p_H =$									
	3,2	4,1	5,3	6,2	7,0	8,1	9,2	10,2	11,1	12
1,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,0625	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,032	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—
0,016	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—
0,008	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—
0,004	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Hiernach lag, wie auch alle weiteren Versuche ergaben, das Wirkungsoptimum für die Gelatineverflüssigung zwischen p_H 8 bis 10.

Zur genaueren Festlegung des Reaktionsoptimums bediente ich mich nun zweier anderer Methoden. Als erste benutzte ich die von *Willstätter*, *Waldschmidt* und *Persiel*¹ angegebene Gelatinemethode, die auf der Zerlegung der Gelatine und der titrimetrischen Bestimmung der frei gewordenen sauren Valenzen beruht. Und außerdem stellte ich Versuche nach *Ringer* und *Gutterink*² mit Spiritblaufibrin an und bestimmte die frei gewordene Farbstoffmenge.

Was zunächst die erstgenannte Methode anbetrifft, so folgte ich genau der Vorschrift von *Willstätter* und *Persiel* und ließ 2,0 ccm einer stark wirksamen 1%igen Takadiastaselösung unter Zusatz der entsprechenden Pufferlösung auf 10 ccm einer 4%igen Thymolgelatine 2 Stunden bei 38° C einwirken, führte dann das Gemisch in siedenden absoluten Alkohol über, unter Vermeidung von Klumpenbildung, und titrierte aus einer Mikrobürette mit $n/5$ KOH gegen Thymolphthalein als Indikator. Von diesem Werte wurde der im Vergleichsversuch ermittelte subtrahiert. Diese Versuche habe ich mehrmals wiederholt, und da die Ausschläge sehr gering waren, eine zweite Reihe von Versuchen angestellt mit 3%iger Fermentlösung und vierstündiger Versuchsdauer. Als Beleg gebe ich je einen Versuch dieser Art in folgender Tabelle wieder.

Zweistündiger Versuch		Vierstündiger Versuch	
p_H der Lösung	Spaltung (ccm $n/5$ KOH)	p_H der Lösung	Spaltung (ccm $n/5$ KOH)
2,3	0,19	3,8	0,26
3,2	0,24	4,4	0,35
4,3	0,33	5,0	0,49
5,0	0,37	6,3	0,58
6,2	0,37	7,2	0,78
7,1	0,39	7,7	0,88
7,7	0,41	8,0	0,97
8,2	0,41	8,3	0,92
9,3	0,28	8,8	0,74

¹ *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **132**, 181, 1924; *Willstätter* und *Persiel*, ebendaselbst **142**, 245, 1925.

² *Ringer* und *Gutterink*, ebendaselbst **156**, 276, 1926.

Aus beiden Versuchsreihen geht übereinstimmend hervor, daß das Wirkungsoptimum für den Gelatineabbau zwischen p_H 7,7 und 8,3 liegt; es erscheint also im Vergleich zu dem der Gelatineverflüssigung nach dem neutralen Punkte zu verschoben.

Sodann stellte ich Versuche mit Spritblaufibrin an, das ich mir nach der Vorschrift von *W. E. Ringer* und *Gutterink* aus frischem, blutfrei gewaschenem Rinderfibrin bereitet hatte, und verwandte für jede Portion 0,1 g. Zunächst ließ ich den Puffer allein in einer Flüssigkeitsmenge von 12 ccm auf das Fibrin 30 Minuten bei 38°C einwirken, um das Fibrin zum Quellen zu bringen, brachte dann in jedes Gläschen 1,0 ccm einer 1 %igen Takadiastaselösung und hielt die Gläschen unter ständigem Schütteln 15 Minuten im Wasserbad von 38°C . Hiernach wurden sämtliche Gläschen abgekühlt und nun die Farbstärke der Lösung im *Authenriethschen* Kolorimeter mit Hilfe eines geeigneten Spritblaukeiles verglichen. Die Pufferlösungen waren hier die gleichen wie in den Gelatineversuchen.

Aus einer großen Reihe von Versuchen teile ich nur zwei mit.

p_H der Lösung	Versuch I 15 Min. bei 38°	Versuch II 30 Sek. bei 38°
4,5	6	8
5,2	15	6
6,0	19	28
6,6	22	33
7,1	39	51
7,8	42	57
8,2	43	66
8,6	45	68
9,1	33	50

Hiernach ergibt sich, daß das Optimum der Wirkung bei dem Reaktionsbereich p_H 8,2 bis 8,6 gelegen ist. Gegenüber der Gelatine ist es bei Fibrin etwas nach der alkalischen Seite verschoben.

3. Wirkungsoptimum für Lab.

Endlich prüfte ich noch, bei welcher Reaktion die Labwirkung der Takadiastase am stärksten ist.

Daß die Takadiastase imstande ist, Milch zur Koagulation zu bringen, hat, wie eingangs zitiert, *Wohlgemuth* bereits 1912 festgestellt und ermittelt, daß nach seinem Verhalten gegenüber CaCl_2 das Lab der Takadiastase ein Chymosin ist, demnach in seiner Wirkung dem Kälberlab nahesteht, sich aber von ihm dadurch unterscheidet, daß es vom Antilab des Pferdeserums nur sehr wenig gehemmt wird.

Als Methode wählte ich den Reihenversuch, die Versuchsdauer betrug stets 2 Stunden bei 18°C , danach 15 Minuten bei 38°C . Zunächst

wurde in Vorversuchen ermittelt, bei welcher Reaktion die besten Resultate zu erwarten waren. Es ergab sich, daß die Labwirkung im Bereich von p_H 5 bis 7 am stärksten war.

Sodann wurden, um auch kleinere Unterschiede zu erkennen, mit einer möglichst engen Reihe (zehngliedrig, geometrisch) und bei kleinen Reaktionsunterschieden die Versuche noch einmal unter Innehaltung der gleichen Versuchsdauer (2 Stunden bei 18° C, 15 Minuten bei 38° C) und der gleichen Milchmenge (5 ccm) durchgeführt. Dabei ergab sich übereinstimmend in allen Versuchen folgendes Resultat:

10%ige TakadiastaseLösung	Reaktion p_H =								
	4,5	4,9	5,2	5,8	6,1	6,7	7,0	7,6	8,2
1,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,77	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,46	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,36	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,28	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,22	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,17	—	+	+	+	+	+	+	—	—
0,13	—	+	+	+	+	+	+	—	—
0,1	—	—	+	+	+	+	—	—	—

Hiernach liegt das Optimum der Labwirkung im Bereich von p_H = 5,2 bis 6,7, also bei einer schwach sauren Reaktion. Dieses Resultat war stets das nämliche, ganz gleichgültig, ob ich die Versuchsdauer variierte, und unabhängig von den verschiedenen Milchsorten. Es wurde nur stets frische Vollmilch verwandt, die ich vorher durch scharfes Zentrifugieren vom Rahm möglichst befreit hatte.

Somit ist gegenüber der tryptischen Wirkung das Optimum der Labwirkung erheblich nach der sauren Seite verschoben.

II.

Über Adsorptionsversuche mit Fibrinflocken.

Aus den interessanten Untersuchungen von *Jacoby*¹ geht hervor, daß es gelingt, aus Pepsinlösungen Pepsin sowohl wie Lab auf Fibrinflocken niederzuschlagen und aus einer Pankreatinlösung das Trypsin. Wäscht man solche mit Ferment beladenen Flocken gründlichst mit Wasser, um alle Spuren von noch anhaftender Fermentlösung zu beseitigen, und bringt die mit Pepsin beladenen Flocken in eine dünne Sodalösung, so löst sich das Ferment von der Flocke ab und läßt sich dann mit Leichtigkeit in der Lösung nachweisen. Andererseits gibt eine Trypsinflocke das Ferment an eine schwache Salzsäurelösung ab und kann in ihr nach vorheriger Neutralisation nachgewiesen werden.

¹ *M. Jacoby*, diese Zeitschr. 3, 144 und 248, 1907.

Mich interessierte nun die Frage, ob frisches Fibrin aus einer Takadiastaselösung neben dem Trypsin noch andere in ihr enthaltene Fermente, wie Diastase, Lipase und Lab, adsorbieren kann, und ob sich bei Ablösungsversuchen irgendwelche Unterschiede für die einzelnen Fermente ergeben.

Zu meinen Versuchen benutzte ich frisches Rinderfibrin, das ich mir nach Entfernen sämtlicher Blutbestandteile durch gründliches Waschen in Glycerin aufbewahrt hatte. Ein größeres Quantum Fibrin wird nach Beseitigung des Glycerins in 50 ccm einer 2 %igen Takadiastaselösung eingetragen. Da eine solche Fermentlösung stark proteolytische Wirkung besitzt und schon bei Zimmertemperatur Fibrin leicht zur Lösung bringt, wurde die Fermentlösung vorher durch Einstellen in Eis stark gekühlt. In dieser kalten Lösung hielt ich die Fibrinflocken unter häufigem Schütteln 20 Minuten lang. Danach wurde das Fibrin herausgenommen, fünf- bis sechsmal mit großen Mengen stark abgekühltem, destilliertem Wasser gewaschen, um alle oberflächlich anhaftenden Spuren der Fermentlösung zu entfernen, und nun die Fibrinflocken auf die verschiedenen Fermente geprüft.

Zur Prüfung auf proteolytisches Ferment wurde eine große Flocke in 5 ccm einer 10 %igen Thymogelatine gebracht, zur Prüfung auf Diastase eine andere Flocke in 10 ccm 1 %iger Stärkelösung. Beide Gläschen kamen in ein Wasserbad von 38° C, und es wurde von Zeit zu Zeit geprüft, ob in dem einen die Gelatine sich verflüssigt, und in dem anderen durch Entnahme von kleinen Proben der Stärkeabbau mit Hilfe von Jod verfolgt. In beiden zeigte sich schon nach Verlauf von 10 bis 15 Minuten starke Fermentwirkung; das Gelatinegläschen zeigte nach Einstellen in Eiswasser völlige Verflüssigung, und im Stärkegläschen trat nach Zusatz eines Überschusses von Jod weder Blau- noch Rotfärbung auf, ein Beweis, daß die Stärke mindestens bis zum Archroodextrin abgebaut war.

Mit einer dritten Flocke wurde geprüft, ob auch Lipase sich auf das Fibrin niedergeschlagen hatte. Zu dem Zwecke stellte ich mir eine gesättigte Tributyrinlösung her, die ich mit einem Phosphatgemisch ($p_H = 7,8$) pufferte, und brachte eine vorher gründlichst gewaschene Fibrinflocke in 50 ccm dieser Lösung. Die Gegenwart von Lipase mußte sich durch Änderung der Oberflächenspannung der Lösung bemerkbar machen. Es wurde deshalb gleich zu Beginn die Tropfenzahl der Lösung bestimmt und dann in Intervallen von 30 Minuten die Tropfenabnahme festgestellt. Dabei zeigte sich, daß dieselbe stets eintrat; bei zweistündiger Versuchsdauer betrug die Tropfendifferenz meistens 20 bis 22 Tropfen.

Und endlich prüfte ich mit einer vierten Flocke, ob auch Lab sich auf das Fibrin niedergeschlagen hatte, indem ich die Flocke in 10 ccm

Milch brachte und das Gläschen in ein Wasserbad von 38° C stellte. Nach Verlauf von 15 Minuten war in den meisten Fällen die Milch komplett geronnen.

Damit war zunächst festgestellt, daß Fibrinflocken aus einer Takadiastaselösung neben Trypsin und Lab auch Diastase und Lipase adsorbieren. Nun prüfte ich weiter, wie die einzelnen Fermente sich bei Ablösungsversuchen von der Flocke verhalten bei saurer sowohl wie alkalischer Reaktion.

Ich ging dabei so vor, daß ich je drei annähernd gleich große, mit Ferment beladene Flocken in je 5 ccm n/10 bzw. n/100 bzw. n/1000 HCl brachte, nach 5 Minuten die Lösungen abgoß und nun die Flocken sowohl wie die Lösungen gesondert auf ihren Fermentgehalt prüfte. Die Flocken wurden zunächst durch Waschen mit destilliertem Wasser von allen Säurespuren befreit und dann in 5,0 ccm 10 %iger Thymolgelatine bzw. 5 ccm 1 %iger Stärkelösung und in 50 ccm gesättigte Tributyrinlösung gebracht und in ein Wasserbad von 38° C gestellt. Es ergab sich, daß sowohl die Flocken, die mit n/10 wie die mit n/100, wie die mit n/1000 HCl behandelt worden waren, weder tryptische noch diastatische noch lipolytische Wirkung besaßen. Das Fehlen der Fermentwirkung konnte nun darin seinen Grund haben, daß entweder der Fermentbestand durch die HCl zerstört war oder sich von den Flocken lösgelöst hatte. Wenn letzteres der Fall war, mußte sich ein Teil des Ferments in der Lösung finden. Um das festzustellen, wurde unmittelbar nach Entfernung der Flocken aus den salzsauren Lösungen diese mit Na₂CO₃ gegen Lackmus genau neutralisiert und dann in der üblichen Weise auf ihren Fermentgehalt geprüft. Während in der n/10 HCl sich keine Fermentwirkung mehr feststellen ließ, konnte in den beiden anderen Lösungen noch schwache tryptische, diastatische und lipolytische Wirkung nachgewiesen werden. Das würde also besagen, daß durch HCl die Fermente von der Flocke losgelöst werden können. Daß in dem Versuch mit n/10 HCl kein Ferment in der Lösung nachweisbar war, würde nicht hiergegen sprechen. Denn man darf nicht außer acht lassen, daß HCl von dieser Konzentration für das Trypsin und die Amylase der Takadiastase, wie *Wohlgemuth* und *Szántó*¹ gezeigt haben, ein starkes Gift ist; schon ganz kurzes Verweilen der Takadiastase in so stark saurer Lösung führt nach ihren Versuchen zu schwerer Schädigung oder gar völliger Vernichtung. Wenn man bedenkt, daß die von einer Fibrinflocke adsorbierte Fermentmenge nur eine sehr kleine ist, so ist die Annahme einer nachträglichen Zerstörung des losgelösten Ferments durchaus wahrscheinlich.

¹ O. Szántó, diese Zeitschr. 48, 31, 1912.

In genau der gleichen Weise wie mit HCl wurden auch Versuche mit NaOH in verschiedenen Konzentrationen angestellt. Zur Verwendung kamen n/10, n/100 und n/1000 NaOH. Die Versuchsanordnung war hier die gleiche wie vorhin, das Resultat dagegen ein etwas anderes. Denn in sämtlichen Lösungen ließ sich nach vorhergegangener Neutralisation sowohl tryptische wie diastatische wie lipolytische Wirkung nachweisen.

Danach kann man sagen, daß die von der Fibrinflocke aus Takadiastaselösung adsorbierten Fermente durch Säuren sowohl wie durch Alkalien bei der von mir gewählten Versuchsanordnung wieder abgetrennt werden können, und daß sich hierbei keine nennenswerte Unterschiede ergeben zwischen tryptischer, amylolytischer und lipolytischer Wirkung.

Bezüglich des Ablösungsvorganges sei noch eine andere Beobachtung mitgeteilt, die von Interesse sein dürfte. Wenn ich eine mit Ferment beladene Fibrinflocke in 5 ccm 1%iger Stärkelösung brachte und nach einiger Zeit der Abbau der Stärke bis zum Dextrin vollzogen war, so konnte ich in dieser Lösung auch Trypsin und Lipase nachweisen. Den gleichen Effekt beobachtete ich, wenn ich eine Fermentflocke in 5 ccm Gelatine brachte. Nach Verflüssigung derselben besaß die Lösung auch amylolytische und lipolytische Fähigkeit.

III.

Einfluß der Hitze in Gegenwart von Neutralsalzen.

Von Wohlgemuth¹ und seinen Mitarbeitern ist gezeigt worden, daß, wenn man Pankreasamylase in Gegenwart bestimmter Salze erhitzt, das Ferment lange nicht in dem Maße geschädigt wird, wie wenn man das Erhitzen in destilliertem Wasser bei Abwesenheit von Salzen vornimmt. Dabei ergab sich ganz gesetzmäßig, daß von neutralen Salzen nur diejenigen das Ferment vor der Zerstörung durch Hitze teilweise schützen, die einen aktivierenden Einfluß auf das Ferment haben. So schützen z. B. alle Chloride die Amylase des Pankreas und des Speichels, nicht dagegen die Nitrate oder Sulfate. Dasselbe gilt für das tierische Lab. Dieses wird aktiviert durch CaCl₂, und dieses Salz wiederum schützt teilweise das Lab und mit ihm das Pepsin vor der Vernichtung durch Erhitzen, nicht dagegen Barium- und Magnesiumsalze.

Ich prüfte nun, ob diese Gesetzmäßigkeit auch Gültigkeit für die Takadiastase, speziell für ihre Amylase hat, und ob ein Salz, welches

¹ Wohlgemuth und Sugihara, diese Zeitschr. 163, 253, 1925; Hizume, ebendasselbst 146, 52, 1924.

die Amylase teilweise schützt, gleichzeitig auch für die Tryptase einen gewissen Schutz bedeutet.

Die Amylase der Takadiastase wird, wie *Wohlgemuth* festgestellt hat, ebenso wie die tierische Amylase durch Chloride in ihrer Wirkung, wenn auch in schwächerem Maße verstärkt.

Ich untersuchte deshalb zunächst NaCl und KCl auf ihre schützende Wirkung gegenüber kurzdauernden Hitzeperioden. Ich ging dabei so vor, daß ich je 2,0 ccm einer 1 %igen Takadiastaselösung zusammenbrachte mit 2,0 ccm n/10 NaCl bzw. 2,0 ccm n/10 KCl, außerdem 2,0 ccm Fermentlösung mit 2,0 ccm destilliertem Wasser, alle drei Portionen auf 10 Minuten in ein Wasserbad von 65° C brachte, ab und zu schüttelte, nach dem Erhitzen sofort stark abkühlte und nun in allen drei Gläschen den Diastasegehalt bestimmte. Als Kontrolle diente eine Portion von der Zusammensetzung 2,0 ccm Fermentlösung + 2,0 ccm H₂O, die bei Zimmertemperatur gehalten wurde. Um bei der Fermentbestimmung in allen Reihen ungefähr gleiche Salzmengen zu haben, wurden die Verdünnungen in sämtlichen Portionen mit 1 %iger NaCl-Lösung vorgenommen. Dabei ergab sich folgendes Resultat:

Erhitzt auf 65° C während 10 Minuten.

Fermentmenge	+ n/10 NaCl	+ n/10 KCl	+ H ₂ O	Kontrolle
1,0	+	+	+	+
0,5	—	—	+	+
0,25	—	—	+	+
0,125	—	—	+	+
0,0625	—	—	—	+
0,032	—	—	—	+
0,016	—	—	—	+
0,008	—	—	—	+
$D_{30'}^{380}$	5	5	40	625

Hiernach sind also weder NaCl noch KCl imstande gewesen, die Amylase der Takadiastase vor der Hitzezerstörung zu schützen. Das Resultat war vielmehr ein dem erwarteten gerade entgegengesetztes: die mit Salz versetzten Portionen hatten weit mehr durch die Hitze gelitten als die rein wässrige Lösung. Während in letzterer noch etwa 6,4 % der ursprünglichen Fermentlösung enthalten war, finden sich in den beiden anderen nur noch etwa 0,8 %.

Die Versuche wurden dann weiter ausgedehnt auf die zweiwertigen Metalle Ca, Ba, Mg, deren Chloride die Amylase der Takadiastase stärker aktivieren als die einwertigen Salze.

Die Versuchsanordnung war hier die gleiche wie oben. Auch hier kamen stets n/10 Salzlösungen zur Verwendung und ein Erhitzen auf 65° C während 10 Minuten. Hier wurden bei der Fermentbestimmung

die Verdünnungen in sämtlichen Portionen mit 1 %iger CaCl_2 -Lösung vorgenommen. Das Resultat eines solchen Versuches gebe ich in folgender Tabelle wieder:

Erhitzt auf 65°C während 10 Minuten.

Fermentmenge	+ n/10 CaCl_2	+ n/10 BaCl_2	+ n/10 MgCl_2	+ H_2O	Kontrolle
1,0	+	—	—	+	+
0,5	+	—	—	+	+
0,25	+	—	—	+	+
0,125	+	—	—	+	+
0,0625	+	—	—	—	+
0,032	+	—	—	—	+
0,016	+	—	—	—	+
0,008	—	—	—	—	+
$D_{30'}^{380}$	312,5	0	0	40	625

Es zeigt sich die bemerkenswerte Tatsache, daß CaCl_2 in hohem Maße befähigt ist, die Amylase vor einer weitgehenden Zerstörung durch Erhitzen zu schützen. Die mit Ba und Mg beschickten Portionen dagegen hatten eine noch stärkere Schädigung erlitten als die mit NaCl und KCl versetzten; in ihnen war mit der halbstündigen Bestimmungsmethode keine Fermentwirkung mehr zu verzeichnen.

Dieses Resultat wurde immer wieder gefunden, so oft wir auch die Versuche wiederholten. Es unterliegt demnach keinem Zweifel, daß das Calciumchlorid eine Sonderstellung einnimmt.

Wir untersuchten nun weiter, ob diese Sonderstellung ausschließlich dem Ca-Ion in Rechnung zu setzen ist, oder ob gerade die Verbindung von Ca' und Cl' diesen besonderen Effekt bedingt. Diese Frage entschieden wir so, daß wir die Versuche noch mit einem anderen anorganischen Ca-Salz, dem Calciumnitrat, und einem organischen, dem Calciumlactat, mehrmals wiederholten. Alle Versuche ergaben übereinstimmend folgendes Resultat:

Fermentmenge	n/10 CaCl_2	n/10 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	n/10 $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$	+ H_2O	Kontrolle
1,0	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+	+
0,0625	+	+	+	—	+
0,032	+	+	+	—	+
0,016	+	+	+	—	+
0,008	—	—	—	—	+
$D_{30'}^{380}$	312,5	312,5	312,5	40	625

Hiernach unterliegt es keinem Zweifel, daß ausschließlich das Ca-Ion es ist, das diese starke Schutzwirkung bedingt.

Erwähnt sei noch, daß bei Zusatz von Ca-Salzen die Takadiastase-lösung sich sofort trübt. Während des Erhitzens nimmt diese Trübung stark zu, und am Ende des Versuchs haben sich am Boden des Gefäßes größere Flocken angesammelt. Man könnte nun denken, daß diese Flocken einen Teil des Ferments adsorbieren und so vor der Zerstörung durch Hitze schützen. Dagegen sprechen aber zwei Momente.

Wenn wirklich die Flocken einen wesentlichen Teil des Fermentbestandes adsorbieren, so müßte sich ein deutlicher Unterschied zeigen im Fermentgehalt zwischen der trüben Lösung und der durch scharfes Abzentrifugieren oder Filtrieren vom Niederschlag befreiten, klaren Lösung. In Wirklichkeit ergab sich aber niemals eine Differenz zugunsten der trüben Lösung. Überdies trat ebenso wie bei Zusatz von CaCl_2 auch bei einem solchen von BaCl_2 und MgCl_2 zur Takadiastase-lösung eine diffuse Trübung ein, die sich beim Erhitzen gleichfalls zu einem voluminösen Niederschlag verdichtete. Trotzdem zeigten beide Salze niemals auch nur die geringste Schutzwirkung auf die Amylase, im Gegenteil, gerade in diesen Portionen schien das Ferment vollkommen vernichtet. Demnach kann wohl an einer spezifischen Wirkung des Calciums kaum noch gezweifelt werden.

Gleichzeitig mit der Amylase prüften wir auch das Verhalten des Trypsins in den erhitzten Lösungen. Das Trypsin bestimmten wir in der Mehrzahl der Fälle nach *Fermi* mit 5 %iger Thymogelatine, mitunter auch mit der Caseinmethode von *Gross-Fuld*. Es zeigte sich in allen Versuchen, daß ebenso wie die Amylase auch das Trypsin beim Erhitzen teilweise zerstört wird, und daß die Ca-Salze eine ähnliche Schutzwirkung auf das Trypsin ausüben wie auf Amylase. Allerdings wirkte 10 Minuten langes Erhitzen bei 65°C auf das Trypsin viel stärker zerstörend als auf Amylase, doch bestand in der prozentualen Zersetzung der einzelnen Portionen ein deutlicher Parallelismus zwischen beiden Fermenten. Meist fielen die Versuche folgendermaßen aus: Die nicht erhitzte Kontrolle mit 100 % angesetzt, enthielt nach dem Erhitzen die Ca-Portion 6,25 %, die H_2O -Portion 1,56 %, die NaCl-Portion nur noch 0,78 % der ursprünglichen Trypsinmenge. Auf eine ausführliche Wiedergabe der Protokolle sei, da alle Versuche im gleichen Sinne verliefen, verzichtet.

IV.

Wirkung von Metallen auf Takadiastase.

Durch die Untersuchungen von *Jacoby* und *Shimizu*¹ ist bekannt, daß verschiedene Metalle, wie Eisen, Nickel, Kobalt und Kupfer, ohne

¹ *Jacoby* und *Shimizu*, diese Zeitschr. 128, 95, 1922.

Einfluß auf die Amylase der Takadiastase sind. Ich wollte nun feststellen, ob auch das Trypsin der Takadiastase durch diese und andere Metalle ebensowenig beeinflußt wird, oder ob sich irgendwelche Unterschiede zwischen beiden Fermentwirkungen ergeben.

Zunächst prüfte ich noch einmal das Verhalten der Metalle der Amylase gegenüber. Ich ging dabei so vor, daß ich 1 g des betreffenden Metalles in Pulverform mit 7 ccm der zehnfachen Verdünnung einer 1%igen Ferment-Standardlösung (Glycerin) zusammenbrachte und auf 60 Minuten in ein Wasserbad von 38° C stellte, indem ich die Gläschen häufig schüttelte. Nach Ablauf der Frist wurden die Lösungen von dem Metall scharf abzentrifugiert und in der vollkommen klaren Lösung die Amylase nach *Wohlgemuth* bestimmt. Dabei ergab sich entsprechend der Angabe von *Jacoby* und *Shimizu* in allen Lösungen keine Abnahme der Fermentwirkung. Nur die mit pulverisiertem Zink vorbehandelte Portion zeigte stets eine Abschwächung um 50 % des ursprünglichen Wertes.

Anders dagegen war das Resultat bei der Prüfung auf Trypsin. Dieselbe nahmen wir stets nach der Methode von *Fermi* mit 5%iger Chloroformgelatine vor unter Verwendung von je 2,0 ccm Gelatine pro Gläschen. Hier zeigte sich außer bei der Zinkportion auch beim Kupfer stets eine beträchtliche Abnahme, und mitunter beobachtete ich auch in der Eisenportion eine geringe Abschwächung. Diese kam hier und in der Kupferportion sehr oft erst dann deutlich zum Ausdruck, wenn ich den Fermiversuch auf 24 Stunden ausdehnte. Auf die Wiedergabe von Versuchsprotokollen sei verzichtet.

Jacoby und *Shimizu* haben auch gezeigt, daß es gelingt, die Amylase der Takadiastase, die durch kleine Mengen Sublimat inaktiviert ist, durch Zusatz geeigneter Mengen Cyankalium zu reaktivieren.

Ich überzeugte mich davon in besonderen Versuchen; doch ist es nicht ganz einfach, die besten Versuchsbedingungen ausfindig zu machen. Mir hat hierbei das sogenannte Einreihenverfahren von *Wohlgemuth*¹ sehr gute Dienste geleistet. Ich ging bei diesen Versuchen so vor, daß ich zunächst mit Hilfe eines Reihenversuches von 30 Minuten Dauer feststellte, welche kleinste Menge einer 1%igen Sublimatlösung noch imstande ist, 1,0 ccm einer 0,04%igen Takadiastaselösung in seiner Wirkung vollkommen zu hemmen (Resultat: 0,125 mg Sublimat.) In einer zweiten Reihe ermittelte ich nun, welche Menge einer 1%igen NaCN-Lösung imstande ist, das durch 0,125 mg Sublimat inaktivierte Ferment zu reaktivieren. Es ergab sich, daß 0,25 mg, besser noch 0,125 mg NaCN die Amylase teilweise reaktivierten.

¹ *Wohlgemuth*, Fermentmethoden, S. 50. Berlin 1913.

In gleicher Weise prüfte ich das Verhalten des Trypsins, und es zeigte sich, daß ebenso wie die Amylase, auch das Trypsin durch Sublimat inaktiviert wird. Nur sind hierfür viel größere Mengen HgCl_2 erforderlich. So konnte ich erst bei Zusatz von 5 mg HgCl_2 zu 1,0 ccm einer 0,04 %igen Takadiastaselösung eine Hemmung der Gelatinase beobachten, also bei einer 40mal größeren als bei der Diastase. Dementsprechend war auch die kleinste erforderliche Menge an NaCN für die Reaktivierung eine viel größere; sie betrug etwa 3 bis 5 mg.

Durch diese Beobachtung, daß man in einer Takadiastaselösung die Amylasewirkung schon durch äußerst kleine Mengen von HgCl_2 unterdrücken kann, ohne dadurch irgendwie die Gelatinasewirkung zu schädigen, ist die Möglichkeit gegeben, das Trypsin in Abwesenheit der Amylasewirkung zu untersuchen. Das Verhalten des Labs und der Lipase wurde bisher nicht weiter geprüft. Untersuchungen darüber sind aber im hiesigen Laboratorium im Gange.

V.

Phenoloxydase.

Daß dieses Ferment in der Takadiastase vorhanden ist, darauf hat bereits *Wohlgemuth* kurz hingewiesen, indem er feststellen konnte, daß Takadiastaselösung imstande ist, Adrenalin zu oxydieren.

Ich habe nun geprüft, ob Takadiastase befähigt ist, noch andere hydroxylierte Benzolderivate zu oxydieren, und ob sich Unterschiede erkennen lassen zwischen einfach und zweifach hydroxylierten. Von letzteren untersuchte ich Brenzkatechin und Dioxyphe nylalanin, von ersteren das Tyrosin.

Es ergab sich, daß Dioxyphe nylalanin sehr leicht zu einem schwarzen Farbstoff oxydiert wird, wesentlich langsamer und unvollständiger dagegen Brenzkatechin; hier nahm die Lösung erst nach Verlauf von vielen Stunden, meist erst am nächsten Tage eine hellbraune Farbe an. Weit schneller als Brenzkatechin wird Adrenalin oxydiert; hier nimmt die Lösung schon nach einer halben Stunde zunächst eine hellrote Farbe an und geht dann allmählich in eine braune über. Tyrosin hingegen wurde von keinem der mir zur Verfügung stehenden Fermentpräparate angegriffen, auch wenn ich die Versuche über 8 Tage ausdehnte, ebensowenig das Dipeptid Glycyl-tyrosin. Hierbei sei bemerkt, daß ich niemals eine Spaltung des Dipeptids in seine beiden Komponenten beobachten konnte, und daß meine Fermentlösungen auch nicht imstande waren, Tyrosin aus Seidenpepton abzuspalten.

Die von *Wohlgemuth* beobachtete Dunkelbraun- bis Schwarzfärbung der Fermentlösung konnten wir zunächst gleichfalls bei allen drei Präparaten konstatieren, sobald wir die aus ihnen bereiteten Lösungen mehrere Tage stehen ließen. Dieses Dunkelwerden konnte

bedingt sein entweder durch die Oxydation von Tyrosin oder einem anderen Benzolderivat. Tyrosin ist nun zwar in allen Takadiastasepräparaten enthalten, wie wir uns durch positiven Ausfall der *Millon*-schen Reaktion überzeugen konnten; da aber Tyrosin von der Takadiastase nicht angegriffen wird, so mußte ein anderes Benzolderivat die Quelle für den braunen bzw. schwarzen Farbstoff sein. Nun ist nach den Angaben von *Wohlgemuth* in der Takadiastase eine Substanz enthalten, die ganz ähnlich dem Adrenalin die Fähigkeit besitzt, die Froschaugenpupille maximal zu erweitern. Demnach darf man wohl auch annehmen, daß zum mindesten eine dem Adrenalin sehr nahe-stehende Substanz in der Takadiastase enthalten ist. Da nun gezeigt worden ist, daß die Takadiastase eine gut wirksame Adrenalase enthält, so geht man wohl nicht fehl in der Annahme, daß der Abbau dieser pupillenerweiternden Substanz durch die Adrenalase die Ursache für das spontane Dunkelwerden der Fermentlösung ist.

VI.

Verhalten der Takadiastase gegenüber Fibrinogenlösungen.

Elektrische Ladung der Takadiastase.

Gelegentlich hämolytischer Studien mit Takadiastase in Fortsetzung der bereits von *Wohlgemuth*¹ publizierten, wurde die Beobachtung gemacht, daß die Takadiastase imstande ist, Fluornatrium- oder Oxalatblut in geeigneter Verdünnung zur Koagulation zu bringen. Das deutete darauf hin, daß die Takadiastase eine dem Fibrinferment ähnliche Substanz enthalten müsse. Um ein ungefähres Urteil über deren Quantitäten zu bekommen, bestimmte ich mit der Fibrinfermentmethode von *Wohlgemuth*, wieviel sogenannte Fibrinferment-Einheiten in 1 ccm einer 1%igen Takadiastaselösung enthalten sind. Als Fibrinogenlösung verwandte ich Magnesiumsulfat-Plasma, das ich mir nach Vorschrift von *Alexander Schmidt* aus Kaninchenblut in der Weise herstellte, daß ich 3 Teile frisches Blut versetzte mit 1 Teil 28%iger Magnesiumsulfatlösung und die Blutkörperchen durch scharfes Zentrifugieren beseitigte. Von diesem Plasma bereitete ich mir mit 1%iger NaCl-Lösung eine zehnfache Verdünnung und ließ zunächst zur Orientierung auf 2 ccm verdünntes Plasma ein paar Tropfen einer 1%igen Takadiastaselösung einwirken. Schon nach 30 Minuten war die Lösung völlig erstarrt, die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin also eine komplette. Hiernach führte ich den quantitativen Versuch aus und kontrollierte den Ablauf nach 30 Minuten, nach 2, 4 und 24 Stunden. Das Resultat eines solchen Versuchs war folgendes:

¹ l. c., S. 336.

Fermentmenge	Nach 30 Min.	Nach 2 Std.	Nach 4 Std.	Nach 24 Std.
1,0	—	—	—	—
0,5	—	—	—	—
0,25	+	+	—	—
0,125	++	++	+	—
0,0625	+	++	++	+
0,032	—	+++	+++	+++
0,016	—	—	+++	+++
0,008	—	—	—	+++

+++ Komplette Gerinnung. ++ Fast komplett. + Partiell-flüssig.

Auffallend bei diesem Resultat ist zunächst, daß in den ersten Gläschen, die die größten Fermentmengen enthalten und deshalb die stärkste Wirkung erwarten ließen, der Effekt ein negativer und erst bei den stärkeren Verdünnungen eine Gerinnung zu verzeichnen ist. Die Erklärung hierfür ist gegeben in der stark tryptischen Eigenschaft der Fermentlösung, die besonders befähigt ist, Fibrin zu verdauen. Danach versteht man, daß die ersten auftretenden Spuren von Fibrin durch die in den ersten Gläschen noch sehr wirksame Tryptase sofort wieder der Auflösung anheimfallen. Dementsprechend sehen wir auch, daß die in dem dritten Gläschen (0,25) nach 30 Minuten aufgetretene partielle Gerinnung, nach 4 Stunden wieder verschwunden ist, und daß die in dem vierten Gläschen (0,125) eingetretene beträchtliche Gerinnung nach 4 Stunden wieder schwächer wird und nach 24 Stunden vollkommen aufgehoben ist. Deshalb fielen auch meine ersten Versuche, die ich bei einer Temperatur von 38° C ausgeführt hatte, sämtlich negativ aus, und erst als ich bei Zimmer- oder Eisschranktemperatur arbeitete, bekam ich gute Resultate. Obiger Versuch ist zunächst bei 18°, dann bei 6 bis 7° durchgeführt.

Es fragt sich nun, wie soll man diese koagulierende Wirkung der Takadiastase auffassen, als eine Fermentwirkung oder als einen physikalischen Prozeß, bedingt durch die entgegengesetzte Ladung zweier Kolloide? Damit kommen wir zu der Streitfrage, die selbst für das so unendlich viel untersuchte Fibrinferment bzw. Thrombin bis heute noch keineswegs entschieden ist.

Vom Fibrinferment ist die Wirkung der Takadiastase jedenfalls in dem einen Punkte grundverschieden, daß die Takadiastaselösung beim Stehen an Wirkung nichts oder nur wenig verliert, und daß auch Erhitzen auf 65° C, wobei Amylase und Trypsin, wie ich oben gezeigt habe, stark geschädigt oder gar vernichtet werden, an der koagulierenden Wirkung nicht viel ändert. Ja, kurzdauerndes Erhitzen hat sogar einen günstigen Einfluß auf die Fibrinogen umwandelnde Wirkung der Takadiastase insofern, als infolge der Zerstörung des Trypsins auch in denjenigen Portionen, bei denen sonst das gebildete Fibrin

durch das Trypsin sofort wieder verdaut wird, das Fibrin sich ungestört absetzen kann. Dementsprechend findet man mit einer vorher auf 65° C erhitzten Fermentlösung im Gegensatz zu obigem Versuch in Gläschen 1,0 und 0,5 schon nach 2 Stunden komplette Gerinnung, und diese Gerinnung bleibt hier und in den nachfolgenden Gläschen auch noch nach 24 Stunden unverändert bestehen.

Auf Grund dieser erheblichen Hitzeresistenz neigten wir der Ansicht zu, daß diese Wirkung der Takadiastase aufzufassen ist als die Wirkung eines Kolloids, das die entgegengesetzte elektrische Ladung besitzt wie das Fibrinogen. Letzteres hat als globulinähnlicher Körper eine positive elektrische Ladung. Demnach mußte, wenn unsere Annahme richtig war, die Takadiastase eine negative Ladung zeigen. Denn nur entgegengesetzt geladene Kolloide können sich gegenseitig ausfällen. Ich versuchte die Frage zu entscheiden durch positiv und negativ geladene Metalle und Farbstoffe; von Metallen verwandte ich das positive kolloidale Eisen und das negative Arsensulfidsol, von Farbstoffen das positiv geladene Nachtblau und das negative Kongorot.

Die Versuche wurden so ausgeführt, daß ich zunächst von jedem Metall-Sol eine Reihe mit absteigenden Mengen ansetzte und zu jedem Gläschen die gleiche Menge Takadiastaselösung zufügte. Dabei zeigte sich, daß mit kolloidaler Eisenlösung in einzelnen Gläschen starke Fällung auftrat, während Arsensulfidsol in sämtlichen Konzentrationen ohne Einfluß blieb. Entsprechende Versuche wurden mit den beiden Farbstofflösungen angestellt. Das Resultat fiel ganz analog den Metallversuchen aus: das positive Nachtblau rief verschiedentlich starke Fällung hervor, Kongorot dagegen war in allen untersuchten Konzentrationen wirkungslos.

Hiernach dürfte wohl der Schluß berechtigt sein, daß die Takadiastase eine negative elektrische Ladung besitzt.

Damit ist natürlich noch keineswegs gesagt, daß unsere Annahme eines physikalischen Vorganges bei der Koagulation von Fibrinogen durch Takadiastase bewiesen ist. Der Nachweis, daß die Takadiastase ein negativ geladenes Ion ist, besagt nur, daß nichts gegen eine solche Annahme spricht.

Zu dem gleichen Resultat bezüglich der elektrischen Ladung der Takadiastase sind, wie wir erst nach Abschluß unserer Versuche erfahren, *Goodwin* und *Hanger*¹ gekommen auf Grund von Verteilungsversuchen zwischen Gelatine und überstehender Flüssigkeit bei verschiedenem p_H .

¹ *T. C. Goodwin* und *J. C. Hanger*, Proc. of the soc. f. exper. biol. and med. **23**, 261, 1926.

Zusammenfassung.

1. Das Wirkungsoptimum der in der Takadiastase enthaltenen Amylase liegt für Stärkespaltung bis zum Dextrin bei $p_H = 6,2$ bis $7,2$; das der Tryptase für Gelatinespaltung bei $p_H = 7,7$ bis $8,3$, für Fibrinspaltung bei $p_H = 8,2$ bis $8,6$, das des Labfermentes bei $p_H = 5,2$ bis $6,7$.

2. Fibrinflocken adsorbieren ebenso wie Trypsin auch Diastase, Lipase und Lab. Unter geeigneten Versuchsbedingungen gelingt die Ablösung der Fermente von den Flocken mit Hilfe schwacher Säuren und Alkalien. Sie gelingt auch, wenn man z. B. eine Fermentflocke auf Stärkelösung wirken läßt; es findet sich dann in der abgebauten Stärkelösung neben Diastase auch Trypsin.

3. Erhitzen einer Takadiastaselösung auf 65°C während 10 Minuten schädigt die Amylase sehr stark, in Gegenwart von NaCl und KCl stärker als in destilliertem Wasser. Schützend auf die Amylase wirken dagegen anorganische wie organische Ca-Salze, aber nicht Ba- und Mg-Salze; diese wirken vielmehr stark schädigend. Das gleiche Verhalten zeigte auch die Tryptase, nur wird diese durch die gleiche Hitzewirkung viel stärker angegriffen als die Amylase.

4. Metallisches Eisen, Nickel, Kobalt und Kupfer sind ohne Einfluß auf die Amylase, nur Zink ruft eine Schädigung hervor. Trypsin wird aber außer durch Zink auch durch Kupfer und in geringem Maße auch durch Eisen geschädigt. Ebenso wie die Amylase durch Sublimat inaktiviert und durch geeignete Dosen von NaCN wieder reaktiviert werden kann, gelingt es auch, Trypsin durch Sublimat reversibel zu inaktivieren. Nur sind hierfür und für die Reaktivierung durch NaCN weit größere Mengen erforderlich.

5. In der Takadiastase findet sich eine Phenoloxydase, die nur zweifach hydroxylierte Benzolderivate zu oxydieren vermag; gegen Tyrosin ist sie wirkungslos.

6. Unter geeigneten Versuchsbedingungen vermag die Takadiastase Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln. Dieser Vorgang wird aufgefaßt als ein physikalischer Prozeß, bedingt dadurch, daß das negativ geladene Ion der Takadiastase das positiv geladene Fibrinogen zur Entladung bringt. Die negative Ladung der Takadiastase wird bewiesen durch ihr Verhalten positiven und negativen Metall- und Farbstoffen gegenüber.

Einige orientierende Versuche über die physiologische Wirkung von zwei Disulfonen.

Von

A. Récsei (Brünn).

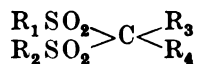
(Aus dem Mährischen Landesforschungsinstitut zu Brünn.)

(Eingegangen am 13. Juli 1927.)

Zwischen chemischer Konstitution und physiologischer Wirkung konnte bisher nur für wenige Verbindungen eine Gesetzmäßigkeit aufgestellt werden.

Die Untersuchungen von *E. Fischer* und *J. Mering*¹ über die substituierten Barbitursäuren ergaben, daß die hypnotische Wirkung durch Einführung von Alkylgruppen bis zum Propyl, Isopropyl gesteigert wird. Von Propyl aufwärts wird die Wirkung wieder abgeschwächt. Ungesättigte Radikale, wie Allyl, Propenyl wirken stärker als die zugehörigen gesättigten. Durch eine glückliche Kombination der Substituenten kann eine potenzierte Wirkung hervorgerufen werden.

In der Reihe der Disulfone besteht auch eine gewisse Regelmäßigkeit. In den Verbindungen



wo R_{1-4} Alkylgruppen darstellen, ist die Anwesenheit von zwei Äthylgruppen eine Bedingung für die hypnotische Wirkung. Durch Einführung von weiteren Äthylgruppen wird die Wirksamkeit gesteigert. Die bekannte, wirksamste Verbindung der Reihe ist das Tetronal.

Nach der Analogie der erhöhten Wirkung der Substituenten in der Barbitursäure- und Disulfonreihe war anzunehmen, daß die Wirksamkeit durch Einführung von Propyl auch über das Tetronal hinaus sich steigern läßt. Der Vergleich der narkotischen Wirkung auf Kaul-

¹ Therapie der Gegenwart 1903, S. 97.

quappen des Sulfonals mit dem von Récsei¹ dargestellten *Butyron-diäthylsulfon* $[(C_2H_5SO_2)_2:C:(C_3H_7)_2]$ bestätigte die obige Annahme.

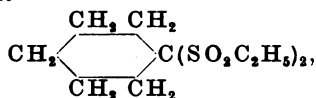
Kaulquappen, 14 Tage alt (15 Stück), werden in die wässrige Lösung von Butyron-diäthylsulfon verschiedener Konzentration und zum Vergleich in Sulfonal gegeben.

Einwirkungs- dauer	Butyron-diäthylsulfon		Sulfonal 1:1000
	konz. 1:2500	1:20 000	
1 Min.	wenig Bewegung	—	—
2 "	ganz gelähmt	—	—
10 "	—	—	wenig gelähmt
15 "	—	wenig Bewegung	"
25 "	—	ganz gelähmt	ganz gelähmt

Die narkotisierten Tiere wurden gewaschen und in frisches Wasser gegeben. Die Kaulquappen aus der stärkeren Butyron-diäthylsulfon-Lösung zeigten nach 10 Minuten beginnende Bewegung, nach 30 Minuten allgemeine Bewegung und nach 40 Minuten waren sie ganz munter, während die aus der Sulfonallösung sich erst nach 40 Minuten bewegten und nach 80 Minuten sich ganz erholt hatten.

Die Wirkung von *Butyron-diäthylsulfon* auf Kaulquappen zeigt also in bezug auf *Konzentration* eine ungefähr 20fach, und in bezug auf *Zeit* eine ungefähr 30fach stärkere Wirkung als Sulfonal. Aus der gleich starken Narkose erholten sich die Tierchen aus Butyron-diäthylsulfonlösung doppelt so rasch als aus der Sulfonallösung.

Auch das *Cyclohexanon-diäthylsulfon* (Récsei¹), dem folgende Konstitution zukommt



wurde auf seine physiologische Wirkung bei Kaulquappen und Meer-schweinchen geprüft.

Die wässrige Lösung von Cyclohexanon-diäthylsulfon an 14 Tage alten Kaulquappen (15 Stück) ergab folgende Wirkung:

Konzentration	Schwache Lähmung	Vollständige Lähmung
1:2000	sofort	10 Sek.
1:3000	1,5 Min.	3 Min.
1:4000	4 "	9 "
1:8000	8 "	14 "
1:10 000	12 "	20 "
1:15 000	20 "	50 "
1:30 000	1 Stde.	tritt nicht ein

¹ Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 60, 1420, 1927.

In einer Sulfonallösung 1 : 1000 zeigten die Tiere, wie vorher, nach 10 Minuten eine schwache, und nach 25 Minuten eine vollständige Lähmung.

Cyclohexanon-diäthylsulfon wirkt also auf Kaulquappen bezüglich *Konzentration* ungefähr *zehnmal* und bezüglich *Zeit* ungefähr *zwanzigmal* stärker narkotisierend als Sulfonal.

Die Tiere aus Cyclohexanon-diäthylsulfonlösung wie auch aus Butyron-diäthylsulfonlösung erholten sich aus der gleich starken Narkose schneller als aus der Sulfonallösung.

Eine größere Konzentration durch kürzere Zeitdauer wirkt also bei gleichem Effekt weniger schädlich als eine verdünnte Lösung durch längere Zeit.

Die Versuche an Meerschweinchen verliefen folgendermaßen:

1. Zwei Meerschweinchen, je 500 g, wurde je 0,1 g Cyclohexanon-diäthylsulfon in wässriger Suspension per os verabreicht. Nach einer halben Stunde schwache Lähmung. Nach 3 Stunden sind die Tiere ganz erholt.

2. Zwei Meerschweinchen, 750 und 800 g, bekamen 1 g Cyclohexanon-diäthylsulfon in Olivenöl gelöst. Nach einer halben Stunden traten klonische Zuckungen, dann Schlaf und ein komaähnlicher Zustand ein. Im Laufe der Nacht starben beide Tierchen.

3. Ein Meerschweinchen, 700 g, bekommt 0,7 g Disulfon in wässriger Suspension. Nach einer halben Stunde trat eine anhaltende Lähmung, jedoch kein Schlaf ein. Nach 6 Stunden Schlaf mit klonischen Zuckungen. Nach 10 Stunden komaähnlicher Zustand und dann nach einigen Stunden Tod. Das sezierte Tier zeigte eine Hyperämie der peripheren Gefäße. Der Magen enthielt eine große Menge einer alkalisch reagierenden Flüssigkeit.

Aus der Hyperämie der peripheren Gefäße konnte auf eine temperaturherabsetzende Wirkung des Cyclohexanon-diäthylsulfons gefolgert werden.

4. Einem Meerschweinchen, 650 g, wurden 0,2 g Disulfon, in Olivenöl gelöst, sterilisiert und intramuskulär injiziert. Die Körpertemperatur des Tieres sank in 1½ Stunden von 40,1 auf 38,5° herab. Von da an stieg die Temperatur bis 39,5° und hielt 5 Stunden hindurch an.

5. 0,1 g Disulfon, in sterilisiertem Olivenöl gelöst, wurde einem Meerschweinchen, 700 g, subcutan appliziert. In 1¼ Stunden sank seine Temperatur von 39,9 auf 38,5°, um wieder langsam zu steigen.

6. 0,05 g subcutan injiziert, zeigte bei einem 550 g schweren Tierchen keine bemerkbare Wirkung.

Dem *Cyclohexanon-diäthylsulfon* geht also bei Meerschweinchen eine hypnotische Wirkung ab. Die narkotisch wirksame Gabe liegt der tödlichen Dosis sehr nahe. Die *letale Dosis* für Meerschweinchen beträgt ungefähr 1 g pro Kilogramm Körpergewicht. Überraschend ist die stark *temperaturherabsetzende Wirkung*, die bisher bei keinem anderen Disulfon beobachtet wurde.

Nach der Theorie von *Meyer*¹ und *Overton*² soll die narkotische Wirkung eines Stoffes von dem sogenannten Teilungskoeffizienten $\left(= \frac{\text{Lipoidlöslichkeit}}{\text{Wasserlöslichkeit}} \right)$ abhängen. Bei Cyclohexanon-diäthylsulfon scheint diese Regel nicht gültig zu sein, da es in Fetten ziemlich gut und in Wasser dagegen nur außerordentlich wenig löslich ist.

Herrn Doz. Dr. *Kříženecký*, Vorstand der Biologischen Abteilung an dem Mährischen Landesforschungsinstitut für Zootechnik, spreche ich für seine freundliche Aufnahme und Unterstützung meinen verbindlichsten Dank aus.

¹ Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 1899, S. 42.

² Studien über die Narkose. Jena 1901.

Studien über Phosphor- und Calciumstoffwechsel bei mangelhaften Kostformen.

I. Mitteilung:

Die Einwirkung ultravioletten Lichtes.

Von

Poul Schultzer (Kopenhagen).

(Aus dem Laboratorium des Finsen-Instituts zu Kopenhagen.)

(Eingegangen am 13. Juli 1927.)

In diesem und den beiden folgenden Artikeln soll eine Reihe von Untersuchungen über den P- und Ca-Stoffwechsel bei Rattenjungen mitgeteilt werden, die auf mangelhafte Kostformen gesetzt waren. Für die wesentlichsten Versuche wurde *Mc Collums* (1) rachitogene Kost Nr. 3143 benutzt, die Ca-reich, aber relativ P-arm ist, und die nach *Mc Collum* nur wenig von dem antirachitischen Faktor enthält. Es wurden auch Modifikationen dieser Kost angewandt, die sich von der ursprünglichen Zusammensetzung dadurch unterschieden, daß sie andere P- und Ca-Mengen enthielten.

Die Absicht bei der Benutzung solcher Kostformen war die, Mängel im Mineralstoffwechsel, besonders im P- und Ca-Stoffwechsel hervor-zurufen; solche Mängel waren zu erwarten, da Rattenjunge bei den angeführten Kostformen rachitische oder rachitisähnliche Knochen-veränderungen entwickeln.

Man stellte sich die Aufgabe, den P- und Ca-Stoffwechsel teils vor, teils nach Instituierung einer Behandlung zu untersuchen, die die hervorgerufenen Knochenveränderungen zum Zurücktreten oder gänz-lichen Verschwinden brachte. Die Behandlungsarten, um die es sich hier handelt, sind folgende drei. 1. Behandlung mit ultraviolettem Licht. 2. Behandlung mit Lebertran. 3. Behandlung durch Kost-änderung, die in einer Ausgleichung des mangelhaften P- und Ca-Gehalts der Kost bestand. Alle drei Behandlungsformen werden von

Mc Collum und anderen amerikanischen Forschern zur Herbeiführung einer Heilung der experimentellen Rattenrachitis als adäquat angeführt. In dieser Abhandlung sollen die Versuche mit *Lichtbehandlung* besprochen werden.

Seitdem *Huldschinsky* in den Jahren 1919 bis 1920 Berichte über die Heilung von Rachitis mit ultravioletten Lichtbädern veröffentlichte, ist die Lichtbehandlung der Rachitis in der ganzen Welt aufgenommen worden. Eine natürliche Folge davon war, daß das Interesse für die Veränderungen im P- und Ca-Stoffwechsel erwachte, die das Lichtbad eventuell hervorrief. *Orr, Holt, Wilkins* und *Boone* (2) fanden bei einigen Versuchen an Kindern, daß das ultraviolette Lichtbad eine erhöhte Resorption und Retention von P und Ca bewirkte. Ihre Versuche waren jedoch gering an Zahl und erstreckten sich nur über relativ kurze Perioden.

Da jedoch *Hess, Unger* und *Pappenheimer* (3) und *Powers, Park, Shipley, Mc Collum* und *Simmonds* (1) schon 1921/22 zeigen konnten, daß das Licht auch einen heilenden Einfluß auf die experimentelle Rattenrachitis hatte, war die Möglichkeit, experimentelle Untersuchungen über die Lichteinwirkung auf den P- und Ca-Stoffwechsel aufzunehmen, auf eine breitere Grundlage gestellt. Von vornherein konnte man sagen, daß die Untersuchungen an Rattenjungen ein sicheres Resultat als Untersuchungen an Kindern müßten ergeben können. Der Grund hierfür war zu allernächst der konstantere Verlauf experimenteller Rattenrachitis. Dazu kommt, daß das Wachstum von Rattenjungen so sehr viel lebhafter als das Wachstum von Kindern ist, weshalb man bei Rattenjungen weit größere Ausschläge im Stoffwechsel als bei Kindern in Perioden von gleicher Länge müßte erhalten können. Es sind denn auch von amerikanischer und englischer Seite Arbeiten über den P- und Ca-Stoffwechsel bei Rattenjungen bei einer Kost vom selben Typ, wie er hier angewandt wurde, erschienen, aber erst beim Abschluß dieser Arbeit haben *Webster* und *Hill* (4) (1925) einige Untersuchungen über die Einwirkungen von Licht und Lebertran mitgeteilt. Die genannten Verfasser haben keine detaillierte Darstellung ihrer Befunde gegeben, aber es scheint aus ihren Arbeiten, die jedoch nur wenige Tiere umfassen, hervorzugehen, daß Licht und Lebertran die Retention von P und Ca vermehrte, und daß die Vermehrung auf einer größeren Resorption beruht. Ähnliche Untersuchungen über die Lichteinwirkung auf rachitische Ferkel wurden von *Orr, Magee* und *Henderson* (5) und *Henderson* (6) gemacht, die dasselbe fanden.

Technik.

Die Versuchstiere waren weißscheckige Rattenjunge, die 40 bis 50 g pro Stück wogen. Sie wurden immer so verwendet, daß den Versuchstieren Kontrollen innerhalb desselben Wurfes entsprachen. Die Zuchttiere wurden mit gemahlenem Hafer ernährt, zu dem Zulagen von Milchpulver, Knochenmehl, Kohlblättern und Rüben gegeben wurden. Wenn die Jungen das angeführte Gewicht erreicht hatten, wurden sie vom Muttertier weggenommen und in die Stoffwechselkäfige übergeführt. Das waren zylindrische Käfige von galvanisiertem Eisenblech, deren Boden aus galvanisiertem Drahtnetz bestand, das die Exkrote hindurch ließ. Die Käfige waren in großen Glastrichtern aufgestellt, in denen ein kleines paraffiniertes Drahtnetz angebracht war, das die Fäzes auffing, während der Urin durch die Trichter-

röhre in einen darunter angebrachten Kolben herabließ. Die Fäzes wurden täglich gesammelt. Die Tiere wurden bei der betreffenden Kost etwa eine Woche gehalten, bevor der Stoffwechselversuch selbst begann. Man benutzte Freßgefäße von einer ähnlichen Konstruktion, wie sie *Mc Collum* als zweckmäßig zur quantitativen Bestimmung der verzehrten Menge pulverförmiger Kost angegeben hat. Die Tiere bekamen destilliertes Wasser zu trinken. Urin und Fäzes wurden in Perioden von 4 Tagen untersucht.

Die Tiere hielten sich während des ganzen Versuchs in einem dunklen Thermostatenzimmer bei 21° auf. Wenn ein Lichtbad verabfolgt werden sollte, wurden die betreffenden Käfige von hier weggebracht, Freßnapfe und Trinkgefäße entfernt und die Käfige unter die Quecksilber-Quarzlampe (*Bachse* Höhensonne) gebracht, die 10 Minuten vorher angestellt war.

Die Exkrete wurden auf dem nassen Wege nach *Neumann* verascht, und nach beendeter Veraschung wurde die Säure auf ein bestimmtes Volumen verdünnt, von dem Quotenteile zur P- und Ca-Analyse entnommen wurden. Bei dem ersten Versuch, der in mehrfacher Hinsicht eine Sonderstellung einnimmt, wurde *Neumann-Gregersen's* Methode zur P-Bestimmung benutzt, wozu die ganze veraschte Menge verwandt wurde. Für die übrigen Versuche benutzte man *Kleinmann's* nephelometrische Methode zur Phosphorsäurebestimmung, eine Methode, die bei Kontrolluntersuchungen gute Resultate erwiesen hatte. Zur Calciumbestimmung brauchte man gleichfalls eine Mikromethode, die nach der *de Waardschen* Methode zur Ca-Bestimmung in Serumasche mit Berücksichtigung der *Shohlschen* Untersuchungen über die Bedeutung von p_H in der Fällungsflüssigkeit ausgebildet war. Auch diese Methode arbeitete zufriedenstellend, so daß man bei beiden Methoden mit einem Fehler von höchstens 3% rechnete. Die Analysen wurden als Doppelbestimmungen gemacht und die Mittelzahl genommen.

Die Kostanalysen für P wurden nach *Neumann-Gregersen* vorgenommen, während die Ca-Analysen nach *Mc Crudden* in der *Shohlschen* Modifikation gemacht wurden.

Im Blutserum wurde der säurelösliche P nach Fällung mit Pikrinsäure-Essigsäurelösung und der Serumkalk nach der *de Waardschen* Methode durch direkte Fällung bestimmt. In fast allen Fällen wurde jedoch sowohl der säurelösliche P als auch der Serumkalk in derselben Serumprobe bestimmt. Man ging dabei in der Weise vor, daß man zunächst den Serumkalk auf gewöhnliche Weise ausfällte und nach Zentrifugierung den säurelöslichen P in der überstehenden Flüssigkeit bestimmte.

A. Nicht-rachitogene, P-arme Kost.

Der erste Versuch, der sich in wesentlichen Punkten von den folgenden unterscheidet, betraf die Einwirkung des ultravioletten Lichtbades auf den P-Stoffwechsel bei Rattenjungen, die mit einer P-armen Kost ernährt waren, die in mehrfacher Hinsicht mangelhaft war. Die Zusammensetzung der Kost war folgende:

Gereinigtes Edestin.	20 Teile
Schmalz	35 „
Butter	5 „
Zucker	28 „
Salzmischung	7 „
Gereinigte Cellulose.	5 „

Die 7 Teile Salzmischung kamen durch Mischung von 6,48 Teilen *Korenchevskyscher* (7) Salzmischung Nr. 4 mit 0,52 Teilen folgender Phosphatmischung zustande:

Sekundäres Kaliumphosphat 20,0 Teile
Primäres Natriumphosphat 10,0 „

Diese Kost war P-arm, indem sie 0,100% P enthielt. Der Gehalt an Ca war etwa 0,44%. Bei dieser Kost wuchsen die Rattenjungen nicht, unter anderem weil sie in bezug auf den wasserlöslichen P-Stoff mangelhaft war, und weil ihrem Proteinstoff die Aminosäure Lysin fehlte, was für das Wachstum notwendig ist (*Mc Collum*). Das Edestin hatte man gewählt, weil es phosphorfrei ist; die Absicht bei der Benutzung dieses Proteinstoffs war ursprünglich die, daß man dadurch imstande war, den P-Gehalt der Kost vollständig zu beherrschen. Die daraus sich ergebenden Unbequemlichkeiten waren jedoch so groß, daß man später von dieser Forderung absah.

Zum Versuch wurden sechs Rattenjungen vom selben Wurf, I₁ bis I₆, verwandt. Der Stoffwechselversuch erstreckte sich über sechs Perioden zu je 4 Tagen. Drei der Tiere (I₄ bis I₆) wurden in den vier letzten Perioden (Nachperioden) täglich mit der *Bachschen* Höhensonne 15 Minuten lang bei einem Lampenabstand von 50 cm bestrahlt.

Kontrolltiere.

Datum	I ₁		I ₂		I ₃	
	Gewicht g	P-Retention mg	Gewicht g	P-Retention mg	Gewicht g	P-Retention mg
1. II.	63		53		51	
11. II.	60		51		52	
15. II.	65	13,0	52	8,3	50	6,6
19. II.	61	9,9	49	6,5	48	4,5
23. II.	61	7,6	48	< 5,1	46	2,5
27. II.	58	6,0	46	3,1	45	3,4
2. III.	55	3,6	42	1,4	42	2,2
6. III.	54	4,9	42	2,1	41	2,0

Lichtbehandelte Tiere.

(Ultraviolette Licht vom 19. Februar.)

Datum	I ₄		I ₅		I ₆	
	Gewicht g	P-Retention mg	Gewicht g	P-Retention mg	Gewicht g	P-Retention mg
1. II.	62		49		60	
11. II.	66		49		55	
15. II.	65	10,5	48	7,1	58	10,3
19. II.	67	8,9	47	7,2	52	4,9
23. II.	63	8,5	45	8,1	53	4,4
27. II.	61	10,4	44	8,3	51	7,5
2. III.	59	9,8	42	5,2	49	5,6
6. III.	58	2,6	41	4,8	47	5,3

Aus den Tabellen geht hervor, daß die Kontroll- und die Versuchstiere nicht nur nicht gewachsen waren, sondern sogar an Gewicht verloren

hatten. Beim Vergleich der zwei Tabellen sieht man, daß die zwei Tiergruppen sich in dieser Beziehung gleich verhielten. In bezug auf ihre Retentionsverhältnisse bestand jedoch ein bedeutender Unterschied. Während die P-Retention bei den Kontrolltieren von Periode zu Periode ziemlich gleichmäßig fiel, trat bei den lichtbehandelten Tieren eine absolute und relative Steigerung in der P-Retention ein, so daß die Lichtbehandlung bewirkte, daß die Tiere I₄ bis I₆ ungefähr doppelt soviel P wie die Kontrolltiere in den Nachperioden retinierten:

	P-Retention in mg	
	Kontrolltiere	Lichtbehandelte Tiere
Vorperioden	48,8	48,9
Nachperioden	43,9	80,5

Bei Durchsicht des Stoffwechselergebnisses zeigte es sich, daß die erhöhte Retention durch eine verminderte P-Ausscheidung in Urin und Fäzes zustande kam.

Nach Abschluß des Stoffwechselversuchs wurden alle sechs Versuchstiere getötet. Bei der Sektion bot das Knorpelsystem keine makroskopischen Zeichen von Rachitis. Der säurelösliche P im Blutserum der Tiere lag auf annähernd derselben Höhe.

Ratte	mg. % säurelösliches P
I ₁	6,5
I ₂	8,3 Kontrolltiere
I ₃	8,5
I ₄	verl. gegang. lichtbehandelte Tiere
I ₅	8,9
I ₆	7,5

Man kann hieraus schließen, daß das ultraviolette Lichtbad imstande ist, die P-Retention in einem beträchtlichen Grade bei Rattenjungen zu verbessern, die eine P-arme Kost erhielten, bei der sie keine makroskopisch wahrnehmbare Rachitis entwickelten.

B. Rachitogene, P-arme Kost (Nr. 3143).

In den folgenden Versuchen wurde die Einwirkung des Lichtbades auf den P- und Ca-Stoffwechsel bei Rattenjungen untersucht, die mit einer Kost ernährt wurden, die makroskopische Knochenveränderungen hervorrief. Es wurden hierzu verschiedene Kosttypen benutzt. Die erste derselben war Ca-reich, aber relativ P-arm (*Mc Collums* Nr. 3143). Die Knochenveränderungen, die von dieser Kost bewirkt wurden, entsprachen denen, die von *Mc Collum* und seinen Mitarbeitern als charakteristisch für die experimentelle Rattenrachitis (eventuell in Verbindung mit Osteoporose) angesehen werden, nämlich weiche Knochen, Schwellung der costo-chondralen Verbindungen sowie verbreiterte Epiphysenlinien und verschiedene andere.

Die Kost war die von *Mc Collum* angegebene rachitogene Kost Nr. 3143.

Mc Collums Kost Nr. 3143.

Gemahlener Weizen	33 Teile
„ Mais	33 „
Pulverisierte Weizengluten	15 „
„ Gelatine	15 „
Calciumcarbonat	3 „
Natriumchlorid.	1 „

Diese Kost enthielt 0,240% P und 1,16% Ca. Der Ca-Gehalt war etwas geringer, als der Berechnung entsprach, was auf der Feuchtigkeit des benutzten Calciumcarbonats beruhte.

Die Versuche erstreckten sich über fünf Perioden zu je 4 Tagen. Die Lichtbadbehandlung begann mit der dritten Periode.

Kontrollen.

Für die Kontrollratten soll zunächst angeführt werden, wieviel diese durchschnittlich pro Tag in den Vorperioden (d. h. den zwei ersten Perioden) und in den Nachperioden (d. h. in den drei letzten Perioden) retinierten. Daneben wird angegeben, wieviel die Tiere durchschnittlich an Gewicht pro Tag in den betreffenden Perioden zunahmen.

	III ₁			III ₂		
	Gew. Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Gew. Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg
Vorperioden	1,0	3,0	4,4	1,8	6,8	8,1
Nachperioden	1,0	3,1	3,9	1,4	5,6	4,6

	IV ₁			IV ₂		
	Gew. Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Gew. Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg
Vorperioden	0,8	6,6	15,0	1,4	7,1	14,6
Nachperioden	1,3	8,0	13,8	1,2	4,0	8,7

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß diese Tiere eher weniger P und Ca in den Nachperioden retinierten, ausgenommen Ratte IV₁, die in den Nachperioden mehr P pro Tag als in den Vorperioden retinierte. Als eine Erklärung dafür, daß sich diese Ratte in dieser Beziehung anders als die übrigen Kontrollratten verhielt, soll angeführt werden, daß ihr Wachstum aus einem oder dem anderen Grunde in den Nachperioden lebhafter als in den Vorperioden war.

Wie der Retentionsprozentsatz sich verhielt, und wie die prozentische Ausscheidung in Urin und Fäzes in den Vor- und Nachperioden war, geht aus untenstehender Tabelle hervor.

	% P			% Ca		
	Urin	Fazes	Retention	Urin	Fazes	Retention
III₁						
Vorperioden . .	2	83	15	23	73	4
Nachperioden . .	5	81	14	23	74	4
III₂						
Vorperioden . .	1	66	34	33	59	8
Nachperioden . .	3	72	25	30	65	4
IV₁						
Vorperioden . .	3	64	33	28	56	16
Nachperioden . .	3	62	35	27	60	13
IV₂						
Vorperioden . .	2	66	31	23	63	14
Nachperioden . .	2	80	17	20	72	8

Nach Abschluß der Versuche wurden die Tiere getötet; sie wurden sezziert und der säurelösliche P und Serulkalk bestimmt.

Ratte	Säurelöslicher P mg.-%	Serulkalk mg.-%	Sektion
III ₁	6,8	12,1	Stark aufgetriebene costochondrale Verbindungen. Rippenfrakturen; <i>Harrisonsche</i> Furche; breite Epiphysenlinie; weiche Knochen.
III ₂	verlorengegangen.	13,2	Verdickte costochondrale Verbindungen; sehr breite Epiphysenlinie, weiche Knochen.
IV ₁	6,5	12,4	Leicht verdickte costochondrale Verbindungen; breite Epiphysenlinie, weiche Knochen.
IV ₂	5,6	12,6	Verdickte costochondrale Verbindungen; breite Epiphysenlinie; weiche Knochen.

Aus den Sektionsbefunden geht hervor, daß es sich um sehr ausgesprochene pathologische Veränderungen vom selben Aussehen gehandelt hat, wie sie von *McCullum* und seinen Mitarbeitern beschrieben sind. Auch die chemische Untersuchung des Blutserums ergab Veränderungen, da der säurelösliche P stark herabgesetzt war. Eine Kontrolluntersuchung von zwölf normalen Rattenjungen ergab einen Durchschnittswert von 11,0 mg.-% P, mit allen Werten innerhalb des Intervalls 9,7 bis 13,5 mg.-% liegend. Das besagt also, daß der säurelösliche P bis auf etwa die Hälfte des Normalwertes herabgesetzt war.

Daß eine Herabsetzung des säurelöslichen P für die menschliche Rachitis charakteristisch ist, wurde erst von *Iversen* und *Lenstrup* (8) und *Howland* und *Kramer* (9a) gezeigt. Eine entsprechende Herabsetzung bei der P-armen Rattenrachitis wurde von *Howland* und *Kramer* (9b) u. a. nachgewiesen.

Im Gegensatz zu dem säurelöslichen P war der Serumkalk nicht sehr verändert. Bei den zwölf normalen Rattenjungen fanden sich durchschnittlich 11,0 mg-% Ca, und die Zahlen variierten zwischen 9,5 und 11,6 mg-%.

Im Vergleich hiermit scheinen die gefundenen Werte etwas höher zu sein, wenn auch sichere Schlüsse aus den wenigen Zahlen nicht gezogen werden können; jedoch habe ich aus einer Reihe anderer Untersuchungen gesehen, daß das Phänomen recht konstant ist. Es kann auch gar nicht wundernehmen, daß die kalkreiche Kost insonderheit, den Serumkalkspiegel etwas zu heben; beim Menschen haben *Jansen* (10) und *Bluedorn* (11) und beim Hunde hat *Hjort* (12) eine Steigerung des Serumkalkspiegels bei peroraler Verabfolgung von Kalksalzen gesehen.

Ultraviolett Licht.

Die Ratten III₃ und III₄ — vom Wurf III — bekamen die letzten 12 Tage von den 20 Tagen des Stoffwechselversuchs täglich ein Lichtbad von 30 Minuten mit der Quecksilber-Quarzlampe in einem Abstand von 1 m.

Das Endresultat des Stoffwechselversuchs wird unten auf dieselbe Art angegeben wie für die Kontrollratten.

	III ₃			III ₄		
	Gew. Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Gew. Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg
Vorperioden	0,6	2,5	5,1	1,3	4,3	9,1
Nachperioden	0,8	7,3	9,0	0,6	6,2	11,0

Hiernach stieg bei der Lichtbehandlung bei beiden Ratten sowohl die P- als auch die Ca-Retention. Die Steigerung war bei III₃ sehr beträchtlich, während sie bei III₄ nicht so groß war. Diese Tiere verhielten sich jedoch, was ihre Wachstumsverhältnisse betrifft, in den Vor- und Nachperioden durchaus nicht gleich. Das eine, III₃, nahm nämlich 0,8 g pro Tag in Nachperioden zu, gegen 0,6 g in den Vorperioden. III₄ nahm dagegen in den Nachperioden weniger zu, nämlich 0,6 g, gegen 1,3 g pro Tag in den Vorperioden. Infolgedessen vermindert sich der Unterschied zwischen III₃ und III₄, da es leicht verständlich ist, daß III₄, das sein Körpergewicht nicht so stark wie III₃ vermehrt, sondern sogar langsamer als vorher wächst, keine so große Förderung der Retention wie III₃ aufweisen kann.

Im Vergleich mit den Kontrollen, besonders III₁ und III₂, die vom selben Wurf waren, zeigten die lichtbehandelten Tiere also einen bedeutenden Fortschritt in der Retention sowohl des P wie des Ca.

Bei der Frage, wie diese vermehrte Retention zustande kam, muß man die verschiedenen Posten in der Stoffwechselrechnung betrachten, um zu entscheiden, ob sie auf einer Verminderung der Ausscheidung mit den Fäzes oder im Urin beruhte.

Im folgenden sollen — wie für die Kontrollratten — die prozentischen Werte der Retention und die in Urin und Fäzes ausgeschiedenen P- und Ca-Mengen angeführt werden.

	‰ P			‰ Ca		
	Urin	Fäzes	Retention	Urin	Fäzes	Retention
III₃						
Vorperioden . .	2	84	14	21	73	6
Nachperioden . .	4	57	39	26	65	9
III₄						
Vorperioden . .	3	73	23	25	65	10
Nachperioden . .	6	61	30	26	63	11

Aus diesen Zahlen geht mit Deutlichkeit hervor, daß die vermehrte Retention auf einer verminderten Ausscheidung mit den Fäzes beruht. Die Ausscheidung im Urin lag während der Lichtbehandlung eher etwas höher. Das will also sagen, daß die Retentionsvermehrung ihren Grund in einer größeren Resorption sowohl von P wie von Ca hatte.

Wie die Kontrollen, wurden die lichtbehandelten Tiere unmittelbar nach Abschluß des Stoffwechselversuchs getötet.

Ratte	Säurelöslicher P mg.‰	Serumkalk mg.‰	Sektion
III ₃	9,2	13,9	Thorax mit rachitischen Veränderungen. Rippenfrakturen und verdickte costochondrale Verbindungen. Epiphysenlinie schmal recht harte Knochen.
III ₄	12,2	15,2	Thorax normal. Epiphysenlinie fast normal; harte Knochen.

Aus der Sektion ging hervor, daß, wenn auch die 12 Tage lange Lichtbehandlung die rachitischen Veränderungen nicht zum Schwinden gebracht hatte, jedenfalls nicht bei III₃, die pathologisch-anatomischen Veränderungen so sehr zurückgegangen waren, daß sich ein sehr bedeutender Unterschied mit den Kontrollen zeigte. Gleichfalls hatte die Lichtbehandlung bewirkt, daß die Werte für den säurelöslichen P bis ganz zu den normalen Werten entsprechend dem gewöhnlichem Befund, sich gehoben hatten. Beim Serumkalk war die Eigentümlichkeit zu beobachten, daß die Lichtbehandlung ihn anscheinend so sehr über das Niveau der Kontrolltiere gehoben hatte, daß man versucht sein könnte, von einer Hypercalcämie zu sprechen, eine Beobachtung, die ich später durch einige Kontrollversuche bestätigen konnte.

C. Rachitogene, Ca-arme Kost.

Ganz entsprechende Stoffwechselversuche wurden mit Rattenjungen bei einer Ca-armen Kost vorgenommen. Diese Kost stellte ich durch

Modifikation von *Mc Collums* Kost Nr. 3143 her, so daß sie folgende Zusammensetzung erhielt:

Weizen	33	Teile
Mais	33	„
Weizengluten	15	„
Gelatine	15	„
NaCl	1,0	„
Phosphatmischung	1,75	„

Die angewandte Phosphatmischung bestand aus zwei Teilen sekundärem Calciumphosphat und einem Teile primären Natriumphosphat. Die Analysen dieser Kost ergaben, daß sie 0,594% P und 0,092% Ca enthielt.

Kontrollen.

Das Resultat des Stoffwechselversuchs an den drei Kontrollratten VI₁, VI₂ und VI₃ geht aus den folgenden Tabellen hervor:

	VI ₁			VI ₂			VI ₃		
	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg
Vorperioden .	0,6	0,9	0,8	1,1	3,0	1,9	0,3	1,5	2,5
Nachperioden	0,6	1,3	1,0	0,8	2,4	2,2	0,5	1,2	1,9

Berechnet man die prozentischen Retentionswerte der aufgenommenen Menge und gleichfalls dieselben Werte der Ausscheidungen mit Urin und Fäzes, so erhält man untenstehende Zahlen:

	% P			% Ca		
	Urin	Fäzes	Retention	Urin	Fäzes	Retention
VI ₁						
Vorperioden . .	74	24	3	0	85	15
Nachperioden . .	72	25	3	3	81	17
VI ₂						
Vorperioden . .	69	23	8	0	68	32
Nachperioden . .	72	22	6	1	65	33
VI ₃						
Vorperioden . .	73	23	4	0	57	43
Nachperioden . .	74	23	3	4	64	31

Nach Abschluß des Stoffwechsels wurden die Tiere getötet und untersucht.

Ratte	Säurelöslicher P mg ⁰ / ₀	Serumkalk mg ⁰ / ₀	Sektion
VI ₁	12,3	6,0	Verdickte costochondrale Verbindungen; mehrere Rippenfrakturen; verbreiterte Epiphysenlinie; weiche Knochen.
VI ₂	10,5	6,4	Dasselbe.
VI ₃	11,1	7,2	Verdickte costochondrale Verbindungen; mehrere Rippenfrakturen; ziemlich schmale Epiphysenlinie.

Aus dieser Untersuchung geht hervor, daß diese Ratten in den untersuchten Punkten völlig dem Befund entsprachen, den *Mc Collum* und seine Mitarbeiter an Ratten bei der sogenannten „calciumarmen Rachitis“ beschrieben hatten. Während die Zahlen für den säurelöslichen P normal waren, fanden sich für den Serumkalk stark herabgesetzte Werte. Diese Herabsetzung war so groß, daß sie die Gedanken auf die Herabsetzung lenkte, die sich sowohl bei spontaner Kindertetanie als auch bei experimenteller parathyreopriver Hundetetanie findet. Jedoch zeigten die Tiere keine Symptome, die auf Tetanie hindeuten könnten.

Bei der Sektion fanden sich die gleichen makroskopischen pathologisch-anatomischen Veränderungen wie bei den Ratten bei der phosphorarmen Kost. Da ich keine histologischen Untersuchungen vorgenommen habe, bleibt die Frage offen, wie weit diese Veränderungen auch bei den mikroskopischen Untersuchungen bei den beiden Kostproben übereinstimmen, d. h. ob sie auf eigentlich rachitischen oder osteoporotischen Veränderungen beruhen.

Ultraviolettes Licht.

Die lichtbehandelten Ratten auf Ca-armer Kost, VI₄ und VI₅, bekamen wie die Ratten auf der P-armen rachitogenen Kost in den Nachperioden tägliche Lichtbäder. Das Lichtbad wurde in der gleichen Weise verabfolgt, nämlich Höhensonne (*Hanau*), jedoch 15 Minuten bei einem Lampenabstand von 1 m.

Bei diesen Ratten fand sich folgendes:

	VI ₄			VI ₅		
	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg
Vorperioden	1,1	1,6	1,8	1,0	3,0	2,8
Nachperioden	1,5	7,4	6,2	1,5	7,4	6,7

Im Vergleich mit den Kontrollratten handelte es sich hier um eine sehr bedeutende Vermehrung von P- und Ca-Retention während der Behandlung mit ultraviolettem Licht, da die Werte in den Nachperioden zwei- bis dreimal höher als die Werte in den Vorperioden waren.

Wie diese große Retentionserhöhung zustande kam, wird man aus den prozentischen Zahlen ersehen.

	% P			% Ca		
	Urin	Fäzes	Retention	Urin	Fäzes	Retention
VI₄						
Vorperioden . .	78	18	4	0	70	30
Nachperioden . .	74	11	15	0	17	83
VI₆						
Vorperioden . .	75	16	8	0	52	48
Nachperioden . .	72	13	15	1	13	86

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß die Retentionserhöhung ihre Ursache hauptsächlich in einer stärkeren Resorption hatte. Für Ca liegen die Verhältnisse sehr einfach, da die Tiere praktisch weder in den Vor- noch Nachperioden durch den Urin kein Calcium ausschieden. In den Nachperioden wuchs die Resorption, und in der dritten Nachperiode lag die Resorption und damit die Retention dicht bei 100 %.

Die sehr beträchtliche Vermehrung der Retentionsprozente für P hatte neben der verminderten Ausscheidung mit den Fäzes ihren Grund auch darin, daß die prozentische Ausscheidung im Urin etwas abnahm.

Die Untersuchung nach dem Stoffwechselversuch ergab untenstehendes Resultat:

Ratte	Säurelöslicher P mg. %	Serumkalk mg. %	Sektion
VI ₄	10,8	11,4	Leicht verdickte costochondrale Verbindungen; schmale Epiphysenlinie; Knochen etwas weich, besonders an den Epiphysenlinien.
VI ₆	10,4	11,5	Thorax normal; schmale Epiphysenlinie; harter Knochen.

Die Lichtbehandlung vermochte die niedrigen Werte für den Serumkalk zu normaler Höhe zu bringen, während der säurelösliche P auf demselben — normalen — Niveau wie bei den Kontrollratten blieb.

Die Sektion ergab, daß bei der einen Ratte (VI₄) die pathologisch-anatomischen Veränderungen von derselben Art wie bei den Kontrollratten, doch leichteren Grades waren, während man bei der anderen nicht instande war, etwas Abnormes durch die makroskopische Untersuchung nachzuweisen.

Daß die Lichtbehandlung bei VI₆ im ganzen anscheinend normale Verhältnisse herbeiführte, ist eigentümlich, wenn man diese Ratten auf Ca-armer Kost mit den entsprechenden Tieren auf P-armer Kost vergleicht. Es ist der in die Augen springende Unterschied zwischen diesen beiden

Tiergruppen, daß die Rattenjungen auf Ca-armer Kost weit weniger P und Ca als die anderen retinierten. Daß die P-Retention bei den ersten niedriger war, könnte auf den ersten Augenblick merkwürdig scheinen, aber es findet seine natürliche Erklärung, wenn man den niedrigen Ca-Gehalt der Kost bedenkt. Selbst bei maximaler Ausnutzung des Ca-Gehalts der Kost — wie bei der Lichtbehandlung — ist es doch nur eine relativ geringe Retention, die hierdurch erreicht werden kann. Erinnert man sich dabei, daß bei wachsenden Tieren der allergrößte Teil des aufgenommenen P zusammen mit Ca im Knochensystem abgelagert wird, so liegt die Annahme nahe, daß die niedrige Ca-Retention eine niedrige P-Retention mit sich bringt.

D. Nicht-rachitogene Kost.

Im vorhergehenden wurden einige Versuche mitgeteilt, in denen man die Einwirkung des Lichtes auf P- und Ca-Stoffwechsel an Rattenjungen bei gewissen mangelhaften Kostformen untersuchte. Die beiden ersten Kostformen waren phosphorarm, während die dritte von ihnen Ca-arm war. Außerdem zeichneten sich die letzten beiden von diesen Kostformen dadurch aus, daß sie arm an dem antirachitischen Faktor (*Mc Collum*) waren, während die erste noch weitere Mängel hatte. Wie sich zeigte, wurde der P- und Ca-Stoffwechsel bei diesen Tieren deutlich vom Licht beeinflusst.

Man stellte sich darnach die Aufgabe, zu untersuchen, wieweit das Licht eine Einwirkung auf den P- und Ca-Stoffwechsel bei Rattenjungen hätte, die eine Kost erhielten, die keinen Mangel in bezug auf P und Ca aufwies, deren Gehalt an antirachitischem Faktor jedoch relativ gering war. Nach *Mc Collum* sollte man als Folge solcher Kost keine Entwicklung von Knochenveränderungen erwarten.

Die benutzte Kost hatte folgende Zusammensetzung:

Weizen	33 Teile
Mais	33 „
Weizengluten	15 „
Gelatine	15 „
CaCO ₃	1,2 „
NaCl	1 „

also eine Kost, die wie die Kost Nr. 3143 zusammengesetzt war, nur mit dem Unterschied, daß sie 1,2 Teile CaCO₃ statt 3 Teile enthielt. Diese Kost enthielt 0,276 % P und 0,542 % Ca. Nach *Mc Collum* ist das ein gut abgestimmtes Verhältnis zwischen P und Ca, und wie man gleich sehen wird, entwickelten die Tiere auch keine Knochenveränderungen in Richtung von Rachitis.

Bevor die Stoffwechseluntersuchungen mitgeteilt werden, muß näher besprochen werden, was man bei einer Stoffwechseluntersuchung bei normalen Rattenjungen zu finden erwarten kann. Nach Analysen von *Korenchevsky* (4), *Sherman* und *Pappenheimer* (13), *Buckner* und *Peter* (14) und anderen wird das Skelett bei normalen Rattenjungen mit wachsendem Alter an Mineralbestandteilen schnell reicher. Das bedeutet natürlich, daß man durch eine Stoffwechseluntersuchung wie diese größere P- und Ca-Retention in den Nachperioden als in den Vorperioden erwarten kann. *Boas* (15), die den P- und Ca-Stoffwechsel bei Rattenjungen untersucht

zu haben glaubt, hat jedoch eine mit dem Versuchsgang abweichende Retention gefunden. Das dürfte vermutlich daran liegen, daß die von ihr verwendete Kost nicht zweckmäßig war, besonders bezüglich ihres Gehalts an Proteinstoffen.

Kontrollen.

Für die Kontrollratten VII₁ und VII₂ fanden sich bei der Stoffwechseluntersuchung folgende Zahlen:

	VII ₁			VII ₂		
	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg
Vorperioden	1,9	11,4	17,8	2,8	14,8	21,1
Nachperioden	1,8	9,7	17,3	2,1	16,1	26,3

Bei der einen Ratte, VII₂, zeigte es sich auch, daß die Retentionen in den Nachperioden größer als in den Vorperioden waren. Infolgedessen müßte man fordern, daß die Lichtbehandlung eine größere Veränderung als die bei Ratte VII₂ beobachtete bewirken sollte, bevor man von einer Wirkung des Lichtbades sprechen könnte.

Der Retentionsprozentsatz und die prozentische Verteilung der Ausscheidung mit Urin und Fäzes finden sich unten.

	‰ P			‰ Ca		
	Urin	Fäzes	Retention	Urin	Fäzes	Retention
VII ₁						
Vorperioden . .	2	54	44	23	42	36
Nachperioden . .	2	62	36	13	54	33
VII ₂						
Vorperioden . .	2	45	53	29	32	39
Nachperioden . .	2	45	52	23	33	43

Wie früher wurden die Tiere nach dem Stoffwechselversuch untersucht.

Ratte	Säurelöslicher P mg·‰	Serumkalk mg·‰	Sektion
VII ₁	8,6	11,8	keine Rachitis
VII ₂	10,6	12,7	" "

Es fanden sich bei der Untersuchung keine Zeichen von Rachitis. Die Werte für den säurelöslichen P und den Serumkalk waren normal, und die Sektion gab keine Anhaltspunkte für das Bestehen einer Rachitis bei den Tieren. Auch die Röntgenbilder zeigten nichts Abnormes.

Ultraviolette Licht.

Die beiden lichtbehandelten Ratten VII₃ und VII₄ erhielten, wie die vorigen Ratten, täglich Lichtbäder in den Nachperioden. Es wurden ebenfalls 15 Minuten lang Lichtbäder mit der Höhensonne (*Hanau*) bei einem Lampenabstand von 1 m gegeben. Für diese Ratten fanden sich folgende Zahlen:

	VII ₃			VII ₄		
	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg
Vorperioden	2,9	17,1	22,4	1,6	11,2	17,4
Nachperioden	2,1	15,9	29,6	1,9	14,1	23,6

Die prozentischen Zahlen waren wie unten angeführt:

	% P			% Ca		
	Urin	Fäzes	Retention	Urin	Fäzes	Retention
VII ₃						
Vorperioden . .	2	39	59	34	27	39
Nachperioden . .	3	48	49	23	31	46
VII ₄						
Vorperioden . .	3	52	45	25	40	35
Nachperioden . .	4	45	51	28	29	43

Man ersieht hieraus, daß man in den Nachperioden keine Steigerung der P- und Ca-Retentionen nachweisen konnte, die wesentlich über das hinausging, was man bei der einen Kontrollratte, VII₂, sah. Man muß folglich schließen, daß die Lichtbehandlung keine Einwirkung auf die P- und Ca-Retention bei diesen Ratten hatte, wenn die Kost keine Mängel bezüglich P und Ca aufwies.

Als diese Tiere nach dem Versuch getötet und untersucht wurden, fand sich folgendes:

Ratte	Säurelöslicher P mg.°/o	Serumkalk mg.°/o	Sektion
VII ₃	13,0	12,2	keine Rachitis
VII ₄	12,8	12,4	" "

Wie man ja auch gar nicht erwarten konnte, ergab diese Untersuchung keinen Grund zu der Annahme, daß das Lichtbad irgendwelchen Einfluß

auf die Tiere gehabt hatte. Der Sektionsbefund war wie der bei den Kontrollratten; ebenso der Serumkalk. Die Werte für den säurelöslichen P waren etwas höher als bei den Kontrollratten, aber gleichwohl innerhalb des Intervalls, das man bei normalen Rattenjungen gefunden hatte.

Der besseren Übersichtlichkeit halber sollen zum Schluß die Versuchsergebnisse für die Tiere zusammengestellt werden, die *McCollums* Kost Nr. 3143 oder Modifikationen davon bekamen:

	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Säurelöslicher P mg.°/o	Serumkalk mg.°/o
--	----------------------------	------------------------------	-------------------------------	----------------------------	---------------------

Rachitogene Parme Kost (Nr. 3143).

Kontrollen.

III ₁ Vorperioden . . .	1,0	3,0	4,4	6,8	12,1
Nachperioden . . .	1,0	3,1	3,9		
III ₂ Vorperioden . . .	1,8	6,8	8,1	verlorengegang.	13,2
Nachperioden . . .	1,4	5,6	4,6		

Lichtbehandelte Tiere.

III ₃ Vorperioden . . .	0,6	2,5	5,1	9,2	13,9
Nachperioden . . .	0,8	7,3	9,0		
III ₄ Vorperioden . . .	1,3	4,3	9,1	12,2	15,2
Nachperioden . . .	0,6	6,2	11,0		

Rachitogene Ca-arme Kost.

Kontrollen.

VI ₁ Vorperioden . . .	0,6	0,9	0,8	12,3	6,0
Nachperioden . . .	0,6	1,3	1,0		
VI ₂ Vorperioden . . .	1,1	3,0	1,9	10,5	6,4
Nachperioden . . .	0,8	2,4	2,2		
VI ₃ Vorperioden . . .	0,3	1,5	2,5	11,0	7,2
Nachperioden . . .	0,5	1,2	1,9		

Lichtbehandelte Tiere.

VI ₄ Vorperioden . . .	1,1	1,6	1,8	10,8	11,4
Nachperioden . . .	1,5	7,4	6,2		
VI ₅ Vorperioden . . .	1,0	3,0	2,8	10,4	11,5
Nachperioden . . .	1,5	7,4	6,7		

Nicht-rachitogene Kost.

Kontrollen.

VII ₁ Vorperioden . . .	1,9	11,4	17,8	8,6	11,8
Nachperioden . . .	1,8	9,7	17,3		
VII ₂ Vorperioden . . .	2,8	14,8	21,1	10,6	12,7
Nachperioden . . .	2,1	16,1	26,3		

Lichtbehandelte Tiere.

VII ₃ Vorperioden . . .	2,9	17,1	22,4	13,0	12,2
Nachperioden . . .	2,1	15,9	29,6		
VII ₄ Vorperioden . . .	1,6	11,2	17,4	12,8	12,4
Nachperioden . . .	1,9	14,1	23,6		

Zusammenfassung.

Es wurde die Einwirkung von ultravioletten Lichtbädern auf den P- und Ca-Stoffwechsel bei Rattenjungen untersucht, die verschiedene Kostformen bekamen.

1. Zuerst wurde eine nicht-rachitogene Kostmischung benutzt, deren wesentliche Mängel ihre Armut an P und dem wasserlöslichen B-Stoff waren. Die Rattenjungen verloren bei dieser Kost an Gewicht. Das Lichtbad erhöhte die P-Retention beträchtlich.

2. An Rattenjungen bei *Mc Collumscher* rachitogener P-armen Kost Nr. 3143 bewirkte das Lichtbad eine vermehrte P- und Ca-Retention. Die Ursache war eine größere Resorption. Die Lichtbadbehandlung, die 12 Tage dauerte, brachte die rachitischen Veränderungen zu sehr bedeutendem Rückgang. Der säurelösliche P wurde bis zu normalem Wert heraufgebracht, während der Serumkalk über den Normalwert gebracht wurde.

3. Bei einer Ca-armen Kost, die rachitisähnliche Knochenveränderungen bei Tieren bewirkte, rief das Lichtbad eine bedeutende Vermehrung der P- und Ca-Retention hervor. Bei dieser Kost waren die Werte für die P- und Ca-Retention in den Vorperioden sehr niedrig, und selbst nach der Steigerung während der Lichtbehandlung waren sie niedrig im Vergleich mit denen bei den Ratten bei Nr. 3143. Der Grund war der niedrige Ca-Gehalt der Kost. Selbst bei maximaler Retention blieb die Ca-Retention klein, wodurch auch die P-Retention niedrig bleiben mußte. Unter der Behandlung stieg der Serumkalk bis zu normalen Werten, während sich der säurelösliche P auf normaler Höhe hielt.

4. Beim letzten Versuch wurde eine Kost benutzt, bei der die Tiere keine rachitischen Veränderungen entwickelten. Diese Kost war wie Nr. 3143 zusammengesetzt, enthielt aber weniger CaCO_3 . Es konnte keine Einwirkung des Lichtbades auf den P- und Ca-Stoffwechsel konstatiert werden, wie auch keine Beeinflussung des säurelöslichen P und des Serumkalkes zu verspüren war.

Danach hatte das ultraviolette Lichtbad einen bessernden Einfluß auf den P- und Ca-Stoffwechsel bei Rattenjungen, deren P- und Ca-Retention infolge Mängel der Kost mangelhaft war. Zum Eintreten dieser Wirkung war es nicht notwendig, daß die mangelhafte Kost rachitogen war.

Literatur.

1) G. F. Powers, E. A. Park, P. G. Shipley, E. V. Mc Collum und N. Simmonds, Journ. Amer. Med. Ass. 78, 159, 1922. — 2) W. J. Orr, L. E. Holt, L. Wilkins und F. H. Boone, Amer. Journ. Diseases. Child. 26. 362,

1923. — 3) *A. F. Hess, L. J. Unger* und *A. M. Pappenheimer*, *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* **19**, 8, 1921. — 4) *T. A. Webster* und *L. Hill*, *Brit. Med. Journ.* **1**, 956, 1925. — 5) *J. B. Orr, H. E. Magee* und *J. M. Henderson*, *Biochem. Journ.* **19**, 569, 1925. — 6) *J. M. Henderson*, ebendasselbst **19**, 52, 1925. — 7) *V. Korenchevsky*, *Med. Research Counc. London* 1922. — 8) *P. Iversen* und *E. Lenstrup*, *Köbenhavn* 1920. — 9a) *J. Howland* und *B. Kramer*, *Amer. Journ. Diseas. Child.* **22**, 105, 1921. — 9b) *Dieselben*, *Johns Hopkins Hosp. Bull.* **33**, 313, 1922. — 10) *W. H. Jansen*, *Arch. f. klin. Med.* **145**, 209, 1924. — 11) *K. Blühdorn*, *Monatsschr. f. Kinderh.* **24**, 548, 1923. — 12) *A. M. Hjort*, *Journ. Biol. Chem.* **65**, 783, 1925. — 13) *H. C. Sherman* und *A. M. Pappenheimer*, *Journ. Exper. Med.* **34**, 189, 1921. — 14) *G. D. Buckner* und *A. M. Peter*, *Journ. Biol. Chem.* **54**, 5, 1922. — 15) *M. A. Boas*, *Biochem. Journ.* **18**, 422, 1924.
-

Studien über Phosphor- und Calciumstoffwechsel bei mangelhaften Kostformen.

II. Mitteilung: Die Einwirkung von Lebertran.

Von
Poul Schultzer (Kopenhagen).

(Aus dem Laboratorium des Finsen-Instituts zu Kopenhagen.)

(Eingegangen am 13. Juli 1927.)

In einem früheren Artikel habe ich das Resultat von Stoffwechseluntersuchungen bei Rattenjungen mitgeteilt, wo die Fähigkeit des ultravioletten Lichtbades gezeigt wurde, die P- und Ca-Retention zu vermehren, wenn die Tiere bei einer Kost waren, die entweder in bezug auf P oder auf Ca mangelhaft war. Gleichzeitig hiermit wurde auch die Wirkung des Lebertrans auf den P- und Ca-Stoffwechsel untersucht.

Der Lebertran war außerordentlich lange Zeit sowohl von Ärzten als auch von Tierärzten gegen Rachitis angewandt worden. Da nach Analysen von *Friedleben* (1), *Brubacher* (2), *Schabad* (3) u. a. nachgewiesen war, daß rachitische Kinderknochen eine geringere Menge von Aschebestandteilen als die Knochen normaler Kinder enthielten, lag der Gedanke nicht fern, daß die Heilung der Rachitis unter einer erhöhten P- und Ca-Retention vor sich ging. *Schabad* fand denn auch, daß Lebertranmedikation die P- und Ca-Retention bei Rachitikern verbesserte, und später hat *Schloss* (4) durch umfassende Stoffwechseluntersuchungen das gleiche gefunden. Es ging mit Deutlichkeit besonders aus *Schloss'* Untersuchungen hervor, daß Lebertran eine größere Aufnahme von P und Ca vom Darm aus bewirkte, während die Ausscheidung im Urin konstant blieb.

Es war daher gegeben, den Lebertran bei der experimentellen Rattenrachitis zu prüfen, und *Shipley*, *Park*, *Mc Collum*, *Simmonds* und *Parsons* (5) konnten denn auch 1921 zeigen, daß, wenn man Lebertran Rattenjungen gab, die auf rachitisbewirkenden Kostformen waren, als Folge davon im Laufe weniger Tage eine deutliche Kalkablagerung in den Epiphysenknorpeln eintrat. Ferner zeigten *Howland* und *Kramer* (6) 1922, daß der säurelösliche P bei Ratten bei P-armen Rachitiskost unter Lebertranbehandlung stark anstieg. Eine entsprechende Wirkung auf den herabgesetzten Serumkalk bei kalkarmen Kostformen sahen *Bethke*, *Steenbock*

und Nelson (7). Schließlich haben Goldblatt (8), Korenchevsky (9) und Mc Cann und Barnett (10) gezeigt, daß Lebertranbehandlung den Ca-Gehalt in den Knochen rachitischer Ratten erhöhen kann.

Die Methodik bei den von mir vorgenommenen Untersuchungen war die gleiche wie früher; statt des Lichtbades wurde den Versuchsratten jetzt Lebertran in den Nachperioden gegeben. Die Tiere bekamen täglich Lebertran, den man mittels einer Pipette administrierte.

Wie bei den zuerst mitgeteilten Versuchen wurden verschiedene Kostformen benutzt, eine relativ P-arme (*Mc Collums* rachitogene Kost Nr. 3143), eine Ca-arme Kost und eine Kost mit einem gut abgemessenen P- und Ca-Gehalt. Die Kontrollversuche sind in dem vorigen Artikel mitgeteilt worden.

A. Rachitogene P-arme Kost (Nr. 3143).

Für den ersten Versuch wurde *Mc Collums* rachitogene Kost Nr. 3143 benutzt. Der Lebertran wurde in den Nachperioden in täglichen Mengen von 10 cg gegeben, was dem Gewicht nach 1 bis 2% der verzehrten Kostmenge entsprach. Die drei Versuchsratten IV₃, IV₄ und IV₅ waren vom selben Wurf wie die Kontrollratten IV₁ und IV₂.

Wie bei den früheren Versuchen soll nun das Resultat der Stoffwechseluntersuchung angeführt werden:

	IV ₃			IV ₄			IV ₅		
	Gew. Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Gew. Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Gew. Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg
Vorperioden	0,5	5,3	7,9	0,8	5,0	6,3	0,9	3,4	4,4
Nachperioden	0,5	6,3	9,6	0,7	6,3	12,4	0,1	3,9	7,2

Die Resultate dieser Tabelle sollen nun mit dem Resultat der Kontrolluntersuchungen verglichen werden. Aus diesen letzteren ging hervor, daß die P- und Ca-Retention in den Nachperioden geringer als in den Vorperioden war, mit Ausnahme einer Ratte, IV₁, deren P-Retention in den Nachperioden größer war, während die Ca-Retention etwas geringer war. Jedoch wurde man darauf aufmerksam, daß diese Ratte sich anders als die anderen Ratten verhielt, da sie in den Nachperioden lebhafter als in den Vorperioden wuchs. Die erhöhte P-Retention brauchte deshalb nicht zu bedeuten, daß das Tier relativ reicher an P wurde. (Eine Zusammenstellung der gefundenen Zahlen findet sich am Schluß dieser Abhandlung.)

Von den lebertranbehandelten Ratten hatten alle drei eine Vermehrung sowohl der P- als auch der Ca-Retention in den Nachperioden. Keine dieser Ratten wuchs in den Nachperioden lebhafter als in den Vorperioden. Die beiden IV₃ und IV₄ hatten ungefähr dieselben Wachstumsverhältnisse, während das Wachstum von IV₅ in den Nachperioden bedeutend langsamer vor sich ging. Im Zusammenhang hiermit stand natürlich das

Verhalten, daß die P-Retention von IV₃ in den Nachperioden nicht so sehr stieg wie die P-Retention der beiden anderen Ratten. Bei allen drei Ratten bestand eine ausgesprochene Steigerung der Ca-Retention.

Um eine Vorstellung zu bekommen, wie diese Retentionsvermehrung zustande kam, wird man auch hier die Zahlen betrachten, die prozentual die Ausscheidung mit Urin und Fäzes angeben, sowie die Retention im Verhältnis zu der mit der Nahrung aufgenommenen Menge.

	% P			% Ca		
	Urin	Fäzes	Retention	Urin	Fäzes	Retention
IV ₃						
Vorperioden . .	3	66	31	30	60	10
Nachperioden . .	4	57	36	35	52	13
IV ₄						
Vorperioden . .	3	74	23	28	66	6
Nachperioden . .	5	61	33	35	51	14
IV ₅						
Vorperioden . .	3	76	21	30	64	6
Nachperioden . .	3	70	26	30	59	10

Aus diesen Zahlen geht deutlich hervor, daß die vermehrte Retention auf einer größeren Resorption beruhte. Bei allen drei Tieren nahm die Ausscheidung mit Fäzes in den Nachperioden ab, was man in keinem Falle bei der Ausscheidung im Urin sah, die in einigen Fällen in den Nachperioden sogar größer war.

Als die Tiere nach dem Versuch getötet wurden, war der Befund wie folgt:

Ratte	Säurelöslicher P mg-%	Serumkalk mg-%	Sektion
IV ₃	11,9	15,3	Thorax normal; schmale Epiphysenlinie; harter Knochen.
IV ₄	8,2	15,1	Thorax normal; ziemlich schmale Epiphysenlinie; Knochen etwas weich.
IV ₅	12,5	15,4	Dasselbe.

Man ersieht hieraus, daß unter der Lebertranbehandlung die Werte für den säurelöslichen P bis auf das normale Niveau gingen, und der Serumkalk stieg wie unter der Lichtbehandlung etwas über die Werte der Kontrolltiere. Während die Kontrollen zu den hier genannten Versuchstieren 6 bis 7 mg-% säurelöslichen P hatten, fanden sich bei den lebertranbehandelten 8 bis 12 mg-%, und den 12 bis 13 mg-% Serumkalk der Kontrollen entsprachen 15 mg-%. Was den Sektionsbefund betrifft, so entsprach der einigermaßen dem, was man bei lichtbehandelten Ratten fand. Auch bei den lebertranbehandelten Ratten genügte die 12tägige Behandlung nicht, die pathologisch-anatomischen (rachitischen) Veränderungen ganz zum Schwinden zu bringen, aber die zurückgebliebenen Reste traten im Vergleich mit dem, was man bei den Kontrollen fand, wenig hervor.

B. Rachitogene Ca-arme Kost.

Die Ca-arme Kost war die früher erwähnte Modifikation der Kost Nr. 3143. An Stelle ihres Gehalts an 3 Teilen Calciumcarbonat hatte man 1,75 Teile einer Phosphatmischung (2 Teile sekundäres Kaliumphosphat + 1 Teil primäres Natriumphosphat) hinzugefügt. Diese Kost enthielt 0,594 % P und 0,092 % Ca. Die Tiere bekamen täglich in den Nachperioden 15 cg Lebertran.

	VI ₆			VI ₇		
	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg
Vorperioden	1,0	1,9	2,0	1,9	4,9	2,9
Nachperioden	1,0	5,8	5,3	1,3	5,7	6,8

Ganz wie bei der Lichtbehandlung trat in den Nachperioden eine sehr bedeutende Veränderung im P- und Ca-Stoffwechsel ein, indem sich die Retention stark erhöhte. Die Veränderungen waren am ausgesprochensten bei Ratte VI₆, deren durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit in den Vor- und Nachperioden gleich war. Etwas weniger ausgesprochen, aber doch ganz deutlich, waren die Veränderungen bei VI₇; von dieser Ratte ist jedoch zu bemerken, daß sie in den Nachperioden relativ weniger an Gewicht zunahm.

Beim Vergleich dieser Zahlen mit den entsprechenden für Ratten, die auf P-arme Kost waren, ist auffällig, daß die Zahlen für die durchschnittlichen täglichen Retentionen selbst in den Nachperioden niedrig sind. In dieser Beziehung erinnern sie völlig an die lichtbehandelten Tiere. Bei Untersuchung der prozentualen Werte für die Retention findet man denn auch dieselben Verhältnisse wie bei den lichtbehandelten Tieren.

	% P			% Ca		
	Urin	Fäzes	Retention	Urin	Fäzes	Retention
VI ₆						
Vorperioden . .	78	17	5	0	65	35
Nachperioden . .	75	11	14	0	12	88
VI ₇						
Vorperioden . .	72	16	11	0	57	43
Nachperioden . .	75	13	12	0	10	90

Man ersieht aus den prozentualen Zahlen, daß unter der Lebertranbehandlung die Ca-Retention bis 90 % stieg, wobei also so gut wie der ganze Ca-Gehalt der Nahrung ausgenutzt wurde. Dabei leuchtet ein, daß die absoluten Werte für die Ca-Retention nicht wesentlich größer werden konnten; da, wie in dem vorigen Artikel angeführt, die P-Retention bis zu einem gewissen Grade von der Ca-Retention abhängen muß, wird es verständlich, daß man bei dieser Kost verhältnismäßig kleine Werte auch für die P-Aufnahme findet.

Bei Untersuchung der Tiere nach Versuchsabschluß fand sich folgendes:

Ratte	Säurelöslicher P mg.‰	Serumkalk mg.‰	Sektion
VI ₆	11,2	10,6	Thorax normal; schmale Epiphysenlinie. Knochen etwas weich.
VI ₇	11,7	11,7	Leicht verdickte costochondrale Verbindungen; ziemlich schmale Epiphysenlinie. Knochen weich.

Während die Lebertranbehandlung auf den normalen säurelöslichen P keine Einwirkung hatte, wurde der bei den Kontrollen abnorm niedrige Serumkalk bis zu Normalwerten heraufgebracht. Bei der Sektion fanden sich Veränderungen bei beiden Ratten, aber diese waren klein im Verhältnis zu dem, was man bei den Kontrollen fand. Man beachte, daß bei beiden Tieren die Knochen beim Schneiden weicher als normal waren. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Betrachtungen, die bei der Besprechung der Retentionsverhältnisse angestellt wurden. Zwar erhöhte sich unter der Lebertranbehandlung die P- und Ca-Retention sehr beträchtlich, aber die absoluten Retentionswerte selbst waren doch im Vergleich mit dem, was man bei anderen Kostformen gefunden hatte, sehr niedrig.

Alles in allem ergab diese Durchsicht, daß die lebertranbehandelten Ratten bei der kalkarmen Kost sich ganz so wie die lichtbehandelten Ratten verhielten. Die Lebertranbehandlung vermehrte die P- und Ca-Retention in gleicher Weise, brachte den abnorm niedrigen Serumkalk in die Höhe und die pathologisch-anatomischen Veränderungen zu bedeutendem Rückgang.

C. Nicht-rachitogene Kost.

Schließlich untersuchte man die Einwirkung des Lebertrans an Ratten, die die früher erwähnte Modifikation der *Mc Collumschen* Kost Nr. 3143 bekamen, die anstatt 3 Teile 1,2 Teile Calciumcarbonat enthielt. Diese Kost enthielt 0,276 % P und 0,542 % Ca, und wie früher gezeigt, bewirkte dieses geänderte Verhältnis zwischen dem P- und Ca-Gehalt, daß die Tiere keine rachitischen Veränderungen entwickelten und bei normalen Werten für säurelöslichen P und Serumkalk verblieben. Die Stoffwechseluntersuchung zeigte ferner, daß diese Tiere, im Gegensatz zu den Tieren bei den anderen Kostformen, reichlich P und Ca retinierten, und daß das eine der zwei untersuchten Tiere mehr pro Tag in den Nachperioden als in den Vorperioden retinierte. Dieser letztere Umstand stimmte mit den angestellten Überlegungen überein, denn normale Rattenjungen bekommen mit dem Alter sehr schnell einen größeren prozentualen Gehalt an P und Ca. Wenn man daher an Rattenjungen bei dieser Kost eine Retentionssteigerung in den Nachperioden sieht, wenn die Tiere der einen oder anderen Behandlung unterworfen werden, muß diese Steigerung größer sein als die früher bei den Kontrollen beobachtete Steigerung, um ihr irgend eine Bedeutung beilegen zu können.

Die beiden Versuchstiere, VII₅ und VII₆, bekamen täglich in den Nachperioden 20 cg Lebertran mit Pipette. Das Resultat der Stoffwechseluntersuchung ist folgendes:

	VII ₅			VII ₆		
	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg
Vorperioden	2,4	12,9	21,5	2,3	13,4	20,1
Nachperioden	2,2	13,2	21,5	1,7	13,4	24,4

Auf Grund der angeführten Verhältnisse wird man hier nicht von irgend einer bedeutenden Retentionsvermehrung sprechen können, wenn auch VII₆ mehr Ca in den Nachperioden als in den Vorperioden retinierte. Des Vergleiches wegen seien auch die prozentualen Zahlen für die Retention sowie für die Ausscheidung mit Urin und Fäzes angeführt.

	% P			% Ca		
	Urin	Fäzes	Retention	Urin	Fäzes	Retention
VII ₅						
Vorperioden . .	3	53	44	29	34	37
Nachperioden . .	3	49	48	31	29	40
VII ₆						
Vorperioden . .	2	49	49	26	36	38
Nachperioden . .	3	45	52	24	27	48

Wie üblich wurden die Tiere getötet und untersucht unmittelbar nach Versuchsabschluß.

Ratte	Säurelöslicher P mg.°/o	Serumkalk mg.°/o	Sektion
VII ₅	9,7	12,2	Keine Rachitis. Dasselbe
VII ₆	12,8	11,6	

Diese Untersuchung gab keinen Unterschied gegen die Kontrolltiere.

Der Übersicht halber sollen die wesentlichen Untersuchungsergebnisse in einer Gesamttabelle zusammen mit den früher gefundenen Resultaten bei den Kontrolltieren mitgeteilt werden.

	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Säurelöslicher P mg.°/o	Serumkalk mg.°/o
--	----------------------------	------------------------------	-------------------------------	----------------------------	---------------------

Rachitogene Parme Kost (Nr. 3143).

Kontrollen.

III ₁ Vorperioden . . .	1,0	3,0	4,4	6,8	12,1
Nachperioden . . .	1,0	3,1	3,9	verloren gegang.	13,2
III ₂ Vorperioden . . .	1,8	6,8	8,1		
Nachperioden . . .	1,4	5,6	4,6	6,5	12,9
IV ₁ Vorperioden . . .	0,8	6,6	15,0		
Nachperioden . . .	1,3	8,0	13,8	5,6	12,6
IV ₂ Vorperioden . . .	1,4	7,1	14,6		
Nachperioden . . .	1,2	4,0	8,7		

	Gew.-Verm pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg	Säurelöslicher P mg-%	Serumkalk mg-%
Lebertranbehandelte Tiere.					
IV ₃ Vorperioden . . .	0,5	5,3	7,9	11,9	15,3
Nachperioden . . .	0,5	6,3	9,6		
IV ₄ Vorperioden . . .	0,8	5,0	6,3	8,2	15,1
Nachperioden . . .	0,7	6,3	12,4		
IV ₅ Vorperioden . . .	0,9	3,4	4,4	12,5	15,4
Nachperioden . . .	0,1	3,9	7,2		
Rachitogene Ca-arme Kost.					
Kontrollen.					
VI ₁ Vorperioden . . .	0,6	0,9	0,8	12,3	6,0
Nachperioden . . .	0,6	1,3	1,0		
VI ₂ Vorperioden . . .	1,1	3,0	1,9	10,5	6,4
Nachperioden . . .	0,8	2,4	2,2		
VI ₃ Vorperioden . . .	0,3	1,5	2,5	11,1	7,2
Nachperioden . . .	0,5	1,2	1,9		
Lebertranbehandelte Tiere.					
VI ₆ Vorperioden . . .	1,0	1,9	2,0	11,2	10,6
Nachperioden . . .	1,0	5,8	5,3		
VI ₇ Vorperioden . . .	1,9	4,9	2,9	11,7	11,7
Nachperioden . . .	1,3	5,7	6,8		
Nicht-rachitogene Kost.					
Kontrollen.					
VII ₁ Vorperioden . . .	1,9	11,4	17,8	8,6	11,8
Nachperioden . . .	1,8	9,7	17,3		
VII ₄ Vorperioden . . .	2,8	14,8	21,1	10,6	12,7
Nachperioden . . .	2,1	16,1	26,3		
Lebertranbehandelte Tiere.					
VII ₅ Vorperioden . . .	2,4	12,9	21,5	9,7	12,2
Nachperioden . . .	2,2	13,2	21,5		
VII ₆ Vorperioden . . .	2,3	13,4	20,1	12,8	11,6
Nachperioden . . .	1,7	13,4	24,4		

Zusammenfassung.

Es wurde die Einrichtung einer 12 Tage dauernden Lebertranbehandlung auf den P- und Ca-Stoffwechsel bei Rattenjungen untersucht, die verschiedene Kostformen bekamen.

1. Zuerst wurde *Mc Collums* rachitogene Kost Nr. 3143 benutzt; die Lebertranmedikation erhöhte bei den Versuchstieren die P- und Ca-Retention, was durch eine größere Aufnahme durch den Darm vor sich ging. Mit dieser Veränderung des Stoffwechsels wurden gleichzeitig die pathologisch-anatomischen Veränderungen weniger ausgesprochen, und zugleich wurden die Werte für den säurelöslichen P normal. Der Serumkalk stieg unter der Lebertranbehandlung über das normale Niveau.

2. Darnach wurde eine Ca-arme Kost gebraucht, die bei den Kontrolltieren rachitisähnliche Veränderungen hervorrief. An Tieren bei dieser Kost bewirkte die Lebertranmedikation gleichfalls eine Vermehrung der P- und Ca-Retention, aber sie wurde von den vorher sehr niedrigen Werten nicht auf die gleiche Höhe wie bei den vorigen Tieren gebracht. Die Erklärung dafür war der besonders niedrige Ca-Gehalt der Kost. Selbst bei maximaler Retention blieb die Ca-Retention klein, und dadurch begrenzte sich auch die P-Retention. Gleichzeitig mit der Stoffwechseleränderung stieg der Serumkalk auf die normalen Werte, während der säurelösliche P fast unverändert blieb. Die makroskopischen pathologisch-anatomischen Veränderungen gingen unter der Lebertranbehandlung stark zurück.

3. Schließlich fand eine Kost Anwendung, bei der die Tiere keine pathologisch-anatomischen Veränderungen entwickelten. Diese Kost kam durch Einschränkung des Calciumcarbonatgehalts bei Nr. 3143 zustande. Es war nicht möglich, irgendwelche sichere Wirkung des Lebertrans auf den Stoffwechsel bei diesen Tieren festzustellen, die vorher reichlich P und Ca retinierten. Auch war kein sicherer Einfluß auf den säurelöslichen P oder den Serumkalk zu verspüren.

Man darf hieraus den Schluß ziehen, daß Lebertran die gleiche Einwirkung auf diese Tiere wie das ultraviolette Licht hatte, sowohl was die P- und Ca-Retention betrifft, als auch mit Rücksicht auf den säurelöslichen P und den Serumkalk.

Literatur.

- 1) A. Friedleben, *Jahrb. f. Kinderheilkde.* **3**, 1860. — 2) H. Brubacher, *Zeitschr. f. Biol.* **27**, 517, 1890. — 3) J. H. Schabad, *Zeitschr. f. klin. Med.* **67**, 454, 1909. — 4) E. Schloss, Berlin 1916. — 5) P. G. Shipley, E. A. Park, E. V. McCollum, N. Simmonds und H. T. Parsons, *Journ. Biol. Chem.* **45**, 343, 1921. — 6) J. Howland und B. Kramer, *Johns Hopkins Hosp. Bull.* **33**, 313, 1922. — 7) R. M. Bethke, H. Steenbock und M. T. Nelson, *Journ. Biol. Chem.* **58**, 71, 1923. — 8) H. Goldblatt, *Biochem. Journ.* **17**, 298, 1923. — 9) V. Korenchevsky, *Med. Research Council*, London 1922. — 10) G. F. McCann und M. Barnett, *Journ. Biol. Chem.* **54**, 203, 1922.

Studien über Phosphor- und Calciumstoffwechsel bei mangelhaften Kostformen.

III. Mitteilung:

Veränderung des Phosphor- oder Calciumgehalts der Kost.

Von

Poul Schultzer (Kopenhagen).

(Aus dem Laboratorium des Finsen-Instituts zu Kopenhagen.)

(Eingegangen am 13. Juli 1927.)

In zwei vorangegangenen Artikeln war gezeigt worden, daß ultraviolette Licht und Lebertran einen Einfluß auf den P- und Ca-Stoffwechsel bei Rattenjungen hatten, die mit gewissen Kostformen ernährt worden waren, die entweder mangelhaft in bezug auf P oder Ca waren oder diese zwei Stoffe in einem nicht gut abgestimmten Verhältnis enthielten. Dieser Einfluß äußerte sich in einer erhöhten Retention beider Stoffe, und die vermehrte Retention kam durch eine größere Aufnahme durch den Darm zustande.

Eine der benutzten Kostformen war die bekannte, von *Mc Collum* angegebene rachitogene Kost Nr. 3143. Ihre Zusammensetzung ist folgende:

Weizen	33 Teile
Mais	33 „
Gelatine	15 „
Weizengluten	15 „
Natriumchlorid.	1 „
Calciumcarbonat	3 „

Mc Collum (1) betont, daß diese Kost, von gewissen Mängeln abgesehen, gut zusammengesetzt ist, und diese Mängel sind teils 1. der geringe Gehalt des antirachitischen Faktors, teils 2. das fehlerhafte Verhältnis zwischen ihrem Gehalt an P und Ca, da der Ca-Gehalt (etwa 1,2%) im Verhältnis zum P-Gehalt (0,3%) sehr reichlich ist. Diese beiden Mängel zusammen bewirken nach *Mc Collum*, daß die Kost Rachitis hervorrufend ist. Eine Ausgleichung dieses ungünstigen Verhältnisses zwischen P und Ca genügt nach *Mc Collum*, um der Kost ihre rachitogenen Eigenschaften zu benehmen.

Es wurde nun eine Reihe von Versuchen an Rattenjungen an- gestellt, um zu bestimmen, welchen Einfluß es auf den P- und Ca-

Stoffwechsel hätte, wenn der Gehalt an P und Ca in einer Kost geändert würde, die im übrigen wie Nr. 3143 zusammengesetzt war. In einem Versuch vermehrte man den P-Gehalt der Kost dadurch, daß man ihr eine Phosphatmischung zusetzte; in einem anderen verminderte man den Ca-Gehalt dadurch, daß man vermied, so viel Calciumcarbonat hinzuzusetzen. Schließlich ging man in einem dritten Versuch etwas anders vor; bei diesem waren die Versuchstiere zuerst auf einer nicht-rachitisbewirkenden Kost, die nur eine geringere Menge Calciumcarbonat als Nr. 3143 enthielt. Durch Vermehrung des Ca-Gehalts dieser Kost, so daß sie dieselbe Zusammensetzung wie Nr. 3143 bekam, machte man sie rachitogen, und dabei untersuchte man den P- und Ca-Stoffwechsel.

A. Phosphatzusatz zur *Mc Collums*chen Kost Nr. 3143.

Es wurde früher darüber berichtet, wie der P- und Ca-Stoffwechsel bei Rattenjungen verlief, die auf der *Mc Collums*chen Kost Nr. 3143 waren. Des Vergleiches wegen soll jedoch das Resultat wieder für die Ratten angeführt werden, die vom selben Wurf wie die Versuchsratten waren, um die es sich hier handelt.

Die Versuchsanordnung war die früher beschriebene. In den Vorperioden, d. h. zwei zu je 4 Tagen, waren die Kontroll- und Versuchstiere unter den gleichen Bedingungen. In den Nachperioden, d. h. drei zu je 4 Tagen, verabfolgte man an die Versuchstiere die abgeänderte Kost, die dadurch zustande kam, daß man 7,80 g folgender Phosphatmischung:

2 Teile sekundäres Kaliumphosphat,

1 Teil primäres Natriumphosphat

zu 400 Teilen der ursprünglichen *Mc Collum*-Kost hinzusetzte. Der P- und Ca-Gehalt der Kost änderte sich dadurch.

	<i>Mc Collums</i> Kost Nr 3143	<i>Mc Collums</i> Kost Nr. 3143, dazu Phosphate
P in %	0,240	0,600
Ca in %	1,16	1,14

Diese Koständerung ist analog der, wie sie z. B. *Hess*, *Unger* und *Pappenheimer* (2) vornahmen, indem sie der *Sherman* und *Pappenheimer*-schen Kost Nr. 84 Phosphate zusetzten, wodurch sie eine Kost erzielten, die nicht mehr imstande war, Rachitis hervorzurufen. Diese Autoren verglichen die heilende Wirkung des ultravioletten Lichtbades mit der Phosphatmenge, die imstande war, die Kost Nr. 84 so zu ändern, daß sie ihren ursprünglich rachitogenen Charakter verlöre und nicht mehr imstande war, Rachitis hervorzurufen.

Wie bei den vorhergehenden Versuchen wird das Resultat der Stoffwechseluntersuchung als die durchschnittliche Retention pro Tag in den Vor- bzw. Nachperioden angeführt werden. Doch soll erwähnt werden, daß die P-Retention für die phosphatbehandelten Ratten nicht aus allen drei, sondern nur aus den zwei letzten Nachperioden berechnet wurde. Der Grund dafür ist der, daß man nur dadurch imstande ist, einen Fehler

in der Stoffwechselrechnung zu vermeiden, der durch Wechsel der Nahrung zustande kommen kann. Denn indem die Ratten von der P-armen zur P-reichen Kost übergehen, wird der Inhalt des Magendarmkanals natürlich reicher an P werden, und diese Vermehrung im P-Gehalt des Magendarmkanals wird in der Balanceaufstellung als retinierter P figurieren, ohne es zu sein. Nach Verlauf von 4 Tagen muß ein erreichter Gleichgewichtszustand und die nach dieser Zeit gefundene Retention als reell angenommen werden.

	Gew.-Verm. pro Tag	P-Retent. pro Tag	Ca-Retent. pro Tag	Gew.-Verm. pro Tag	P-Retent. pro Tag	Ca-Retent. pro Tag
	g	mg	mg	g	mg	mg
Kontrollratten.						
		III ₁			III ₂	
Vorperioden . .	1,0	3,0	4,4	1,8	6,8	8,1
Nachperioden . .	1,0	3,1	3,9	1,4	5,6	4,6
Phosphatbehandelte Ratten.						
		III ₇			III ₈	
Vorperioden . .	1,5	5,4	15,2	1,1	5,1	9,9
Nachperioden . .	2,2	13,7	28,1	1,3	10,9	24,2

Durch diese Kontrollversuche sowie die früher angeführten war nachgewiesen, daß die P- und Ca-Retention bei Rattenjungen bei der Kost Nr. 3143 sich verringerte, so daß die Tiere durchschnittlich weniger pro Tag in den Nach- als in den Vorperioden retinierten. Doch hatte man eine Ausnahme beobachtet, wenn ein Tier in den Nachperioden lebhafter als in den Vorperioden wuchs. Aus einem oder dem anderen Grunde hatte in einem Falle eine größere Wachstumsgeschwindigkeit in den Nachperioden stattgehabt. In diesem Falle war die Retention jedoch nur für den P erhöht, und das sogar nicht sehr bedeutend.

Bei beiden phosphatbehandelten Ratten bestand jedoch eine sehr große Retentionsvermehrung sowohl für P wie für Ca. Die Retentionsvermehrung war so bedeutend, daß sie auf keine Weise damit verglichen werden konnte, was man bei der eben erwähnten Kontrollratte gesehen hatte, deren Gewichtsvermehrung sogar relativ sehr viel größer als die dieser Ratten war.

Wie diese vermehrte Retention zustande kam, wird aus den untenstehenden Zahlen hervorgehen, die die prozentuale Größe der Retention, die Ausscheidung mit Urin und Fäzes im Verhältnis zu der mit der Nahrung aufgenommenen Menge angibt.

	‰ P			‰ Ca			‰ P			‰ Ca		
	Urin	Fäzes	Ret.	Urin	Fäzes	Ret.	Urin	Fäzes	Ret.	Urin	Fäzes	Ret.
Kontrollratten.												
			III ₁						III ₂			
Vorperiode . . .	2	83	15	23	73	4	1	66	34	33	59	8
Nachperiode . . .	5	81	14	23	74	4	3	72	25	30	65	4
Phosphatbehandelte Ratten.												
			III ₇						III ₈			
Vorperiode . . .	2	72	27	25	60	16	3	70	26	24	66	11
Nachperiode . . .	10	60	30	5	70	25	9	63	28	5	72	23

Es ist klar, daß von diesen prozentualen Zahlen es die für die Ca-Retention sind, die das größte Interesse haben. Die Voraussetzung, die Zahlen für die Vorperioden mit denen für die Nachperioden direkt vergleichen zu können, ist natürlich die, daß der prozentuale Gehalt der betreffenden Stoffe der gleiche oder annähernd der gleiche ist. Dieses gilt nur für Ca.

Bei Betrachtung der gefundenen prozentualen Werte für den Ca-Stoffwechsel wird einem klar, daß die erhöhte Ca-Retention auf einer verminderten Ca-Ausscheidung im Urin beruhte. Die prozentuale Ausscheidung mit den Fäzes stieg für beide Versuchstiere. Also, unter der Phosphatbehandlung verminderte sich die Ca-Resorption, aber die Ca-Retention wurde gleichwohl größer, weil der Organismus einen größeren Teil der resorbierten Menge bei sich behalten konnte als vorher.

Aus den prozentualen Zahlen geht ferner hervor, daß die erhöhte P-Retention auf einer größeren Resorption beruhte. Die Resorptionsprozente sind in den Vor- und Nachperioden ungefähr gleich, da aber der P-Gehalt der Nahrung in den Nachperioden sich mehr als verdoppelt hat, bedeutet das eine größere Resorption. Es wird relativ mehr P mit dem Urin als in den Nachperioden ausgeschieden.

Unmittelbar nach Abschluß des Stoffwechselversuchs wurden die Versuchstiere getötet und untersucht. Man ging dabei in gleicher Weise vor, wie früher beschrieben. Bei Untersuchung der Kontrollratten fand man, wie früher angeführt, ausgesprochene makroskopische pathologisch-anatomische Veränderungen, wie verdickte costochondrale Verbindungen, breite Epiphysenlinien sowie weiche Knochen. Die chemische Untersuchung des Blutserums ergab eine beträchtliche Herabsetzung des säurelöslichen P, während der Serumkalk von den Normalwerten nicht weiter abwich. Im Gegensatz zu diesen schwereren Veränderungen bei den Kontrollen zeigten die 12 Tage lang phosphatbehandelten Tiere folgendes:

Phosphatbehandelte Ratten.

Ratte	Säurelöslicher P mg. %	Serumkalk mg. %	Sektion
III ₇	9,8	11,7	Keine makroskop. Knochenveränd.; harte Knochen.
III ₈	10,8	11,8	Dasselbe.

Diese Tiere waren nach dieser Untersuchung von den normalen Tieren nicht zu unterscheiden. Die Phosphatbehandlung hatte den herabgesetzten säurelöslichen P zum Normalwert gehoben. Der Serumkalk war unbeeinflusst geblieben. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen waren zum völligen Schwinden gebracht.

Wie in den zwei vorhergehenden Artikeln gezeigt wurde, hatte eine zwölftägige Behandlung mit ultravioletten Lichtbädern oder Lebertran gleichfalls eine sehr bedeutende Einwirkung. Allerdings waren Reste der pathologisch-anatomischen Veränderungen zurückgeblieben, aber im Vergleich mit den Kontrollratten war die Wirkung sehr schlagend. Bei diesen Ratten wurde der säurelösliche P auch unter der Behandlung zur normalen Größe heraufgebracht, während der Serumkalk im Gegensatz zum Befunde bei den phosphatbehandelten Ratten über den normalen Wert gebracht wurde. Ein Vergleich der Stoffwechselveränderungen zeigt auch, daß die Stoffwechseländerung, die in den zwei Fällen eintrat,

von wesentlich verschiedenem Charakter war. Während gezeigt werden konnte, daß die Licht- und Lebertranbehandlung die P- und Ca-Retention durch Hervorrufung einer größeren Resorption dieser beiden Stoffe vermehrte, war das Verhalten bei der Phosphatbehandlung ein anderes, wo die P- und Ca-Retention auch vermehrt wurde, wo aber die erhöhte Ca-Retention dadurch zustande kam, daß die Ausscheidung im Urin stark sank, während die Resorption an Größe abnahm.

B. Kalkabzug von *Mc Collums* Kost Nr. 3143.

In den folgenden Stoffwechselversuchen machte man zum Gegenstand der Untersuchung, welchen Einfluß es auf den P- und Ca-Stoffwechsel von Rattenjungen bei *Mc Collums*cher rachitogener Kost Nr. 3143 hätte, wenn die Kost weniger Ca-reich dadurch gemacht wurde, daß man sich an Stelle von 3 Teilen mit 1,1 Teil Calciumcarbonat in der Kost begnügte. In den Vorperioden wurde die Kost Nr. 3143 verabfolgt, während die Versuchstiere in den Nachperioden die modifizierte Kost bekamen.

Die Änderung der Kost hatte folgenden Einfluß auf ihren Gehalt an P und Ca.

	<i>Mc Collums</i> Kost Nr. 3143	<i>Mc Collums</i> Kost Nr. 3143, modifiziert (1,1 Teil Calcium- carbonat statt 3 Teile)
P in %	0,259	0,265
Ca in %	1,21	0,491

Bevor wir das Resultat der Stoffwechseluntersuchung mitteilen, soll bemerkt werden, daß das gleiche Raisonement, das beim vorigen Versuch mit dem Phosphatzusatz zur Kost angewandt wurde, natürlich auch hier Gültigkeit hat. Hier ist es die Ca-Retention, die in der ersten Nachperiode nicht bestimmt werden kann, wo der Magendarmkanal infolge der Koständerung plötzlich einen geringeren Ca-Inhalt als vorher bekommt. In dieser Periode muß die Berechnung der Ca-Retention ein zu niedriges Resultat ergeben. Man hat sich daher auf der Tabelle damit begnügt, die durchschnittliche tägliche Retention bei den Versuchsratten in den beiden letzten Nachperioden anzuführen.

Kontrollratten.

	Gewichts- vermehrung pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg
IV ₁ .			
Vorperioden . . "	0,8	6,6	15,0
Nachperioden . . "	1,3	8,0	13,8
IV ₂ .			
Vorperioden . . "	1,4	7,1	14,6
Nachperioden . . "	1,2	4,0	8,7

Kalkabzug.

	Gewichts- vermehrung pro Tag g	P-Retention pro Tag mg	Ca-Retention pro Tag mg
IV ₆ .			
Vorperioden . .	1,5	7,5	13,6
Nachperioden . .	2,5	13,9	16,6
IV ₇ .			
Vorperioden . .	1,1	7,3	9,0
Nachperioden . .	2,3	15,3	20,8

Es geht hieraus hervor, daß die Koständerung eine sehr große P- und Ca-Retention verursachte.

Jedoch wird die Erklärung der Bedeutung der erhöhten Retention durch den Umstand erschwert, daß gleichzeitig mit der stark erhöhten Retention ein viel lebhafteres Wachstum in den Nachperioden bei den Versuchstieren beobachtet wurde. Wenn man, wie Aron (3), auf die relative Retention Gewicht legt, d. h. auf die Retention, gemessen im Verhältnis zur Gewichtsvermehrung, findet man keine Steigerung. Nun ist die Hauptvoraussetzung für die Anwendung eines Begriffs wie relative Retention die, daß die Tiere bei ihrem Wachstum ihr Gewebe im gleichen Verhältnis vermehren. Wenn die Koständerung jedoch die Einwirkung auf die Tiere hätte, daß ihr Fettvorrat relativ größer wurde, ist keine Berechtigung vorhanden, mit diesem Begriff zu operieren. Dies Verhalten soll daher nicht weiter diskutiert werden.

Wie die vermehrte absolute Retention zustande kam, geht aus den unten angeführten prozentualen Zahlen hervor.

% P			% Ca		
Urin	Fäzes	Retention	Urin	Fäzes	Retention

Kontrollratten.

IV ₁ .						
Vorperioden . .	3	64	33	28	56	16
Nachperioden . .	3	62	35	27	60	13
IV ₂ .						
Vorperioden . .	2	66	31	23	63	14
Nachperioden . .	2	80	17	20	72	8

Kalkabzug.

IV ₆ .						
Vorperioden . .	4	63	33	22	65	13
Nachperioden . .	3	46	51	19	54	26
IV ₇ .						
Vorperioden . .	4	62	34	29	62	9
Nachperioden . .	4	36	60	31	30	39

Umgekehrt wie im Verhalten bei den phosphatbehandelten Tieren sind es hier die Werte für die prozentuale P-Retention, die zu einem direkten

Vergleich benutzt werden können. Bei beiden Versuchstieren sah man eine bedeutende Steigerung der P-Retentionsprozente. Gleichfalls bestand eine starke Steigerung der Ca-Retentionsprozente; aber da der Ca-Gehalt der Kost in den Vor- und Nachperioden ein verschiedener war, können die Werte nicht direkt verglichen werden. Aus den Zahlen kann man jedoch ersehen, daß die gefundene Steigerung der absoluten Retention auf einer größeren Resorption von Ca beruhen muß, da das Verhältnis zwischen Ca in Urin und Fäzes größer geworden ist.

Die Untersuchung nach dem Versuch ergab folgendes:

Ratte	Säurelöslicher P mg ^o /o	Serumkalk mg ^o /o	Sektion
IV ₆	8,6	12,0	Leicht verdickte costochondrale Verbindungen; schmale Epiphysenlinien, harte Knochen.
IV ₇	11,7	12,2	Dasselbe.

Der Umstand, daß die Ca-reiche rachitogene Kost weniger Ca-reich gemacht wurde, hatte also dieselbe Wirkung auf die Versuchstiere wie der Phosphatzusatz, insofern die Tiere nach Verlauf des 12-Tage-Versuchs sich von den Kontrollen dadurch unterschieden, daß sie normalen säurelöslichen P im Serum bekommen hatten. Wie beim Phosphatzusatz blieb der Serumkalk auf seinem normalen Niveau, ohne durch die Koständerung verändert zu werden. Bei der Sektion fand man ungefähr normale Verhältnisse. Die costochondralen Verbindungen waren allerdings verdickt, aber im Vergleich mit den Kontrollen war das nur ganz gering.

C. Hervorrufung von rachitogener Kost durch Ca-Zusatz.

Beim dritten und letzten Versuch untersuchte man den P- und Ca-Stoffwechsel bei Rattenjungen unter Bedingungen, die sozusagen die umgekehrten von den unter B. besprochenen waren. Die Versuchstiere waren in den Vorperioden auf einer Kost, die wie *Mc Collums* Kost Nr. 3143 zusammengesetzt war, aber 1,2 Teile statt 3 Teile Calciumcarbonat enthielt. Wie früher gezeigt wurde, entwickeln sich die Rattenjungen bei dieser Kost, ohne Zeichen von Rachitis aufzuweisen. Die P- und Ca-Retention ist relativ groß, der säurelösliche P und der Serumkalk ist normal, und schließlich ergibt die Sektion keine Veränderungen. Nach den zwei Vorperioden zu je 4 Tagen gab man in den drei Nachperioden die nicht-modifizierte *Mc Collum*-Kost Nr. 3143, bei der sich eine Rachitis mit niedrigem säurelöslichen P und ausgesprochene pathologisch-anatomische Veränderungen entwickeln. Unten soll der P- und Ca-Gehalt der verwendeten Kostformen angegeben werden.

	<i>Mc Collums</i> Kost Nr. 3143 modifiziert (mit 1,2 Teilen CaCO ₃)	<i>Mc Collums</i> Kost Nr. 3143
P in %	0,276	0,271
Ca in %	0,542	1,20

Bei Berechnung der durchschnittlichen täglichen Retention berücksichtigte man nur die zwei letzten Nachperioden bei den zwei Versuchs-

ratten, die die geänderte Kost bekamen. Der Grund dafür war derselbe wie bei den vorhergehenden Versuchen.

	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retent. pro Tag mg	Ca-Retent. pro Tag mg	Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retent. pro Tag mg	Ca-Retent. pro Tag mg
Kontrollratten.						
		VII ₁			VII ₂	
Vorperioden . .	1,9	11,4	17,8	2,8	14,8	21,1
Nachperioden . .	1,8	9,7	17,3	2,1	16,1	26,2
Ca-Zulage.						
		VII ₇			VII ₈	
Vorperioden . .	2,8	13,5	19,1	2,5	13,3	7,2
Nachperioden . .	1,7	5,4	20,6	1,5	8,5	8,5

Die Koständerung bewirkte einen bedeutenden Rückgang in der P-Retention, während die Ca-Retention unverändert blieb. Wie man sehen wird, war die Wachstumsgeschwindigkeit nach dem Zusatz von Calciumcarbonat sehr viel geringer, aber, wie früher erwähnt, wird die relative Retention nicht weiter diskutiert werden, d. h. das Verhältnis zwischen absoluter Retention und Gewichtsvermehrung in einem gewissen Zeitraum, wegen der Unsicherheit, die mit diesem Begriff verbunden ist.

Die Zahlen sind wie folgt:

	% P			% Ca		
	Urin	Fäzes	Retention	Urin	Fäzes	Retention
Kontrollen.						
		VII ₁				
Vorperioden . .	2	54	44	23	42	36
Nachperioden . .	2	62	36	13	54	33
		VII ₂				
Vorperioden . .	2	45	53	29	32	39
Nachperioden . .	2	45	52	23	33	43
Ca-Zulage.						
		VII ₇				
Vorperioden . .	3	54	44	26	41	31
Nachperioden . .	3	81	16	18	66	15
		VII ₈				
Vorperioden . .	2	49	49	28	39	33
Nachperioden . .	2	71	28	23	63	13

Die Ca-Zulage bewirkte, daß die P-Ausscheidung mit den Fäzes bedeutend stieg, während die P-Ausscheidung im Urin unverändert blieb. Die prozentualen Werte für die Ca-Ausscheidung änderten sich gleichfalls, und zwar auf solche Weise, daß sie den entsprechenden Zahlen für die

früher besprochenen Ratten bei der nicht modifizierten *Mc Collum*-Kost entsprachen. Ein Blick auf die Zahlen für diese Tiergruppen wird zeigen, daß sie sich umgekehrt zueinander verhielten, ganz entsprechend der Behandlung. Die erste Gruppe, IV₆ und IV₇, ging von der *Mc Collum*-Kost in den Vorperioden zu der weniger Ca-reichen Kost in den Nachperioden über. Die andere, VII₇ und VII₈, bekam die weniger Ca-reiche Kost in den Vorperioden, während sie in den Nachperioden die nicht-modifizierte *Mc Collum*-Kost bekam.

Die Untersuchung nach Abschluß des Stoffwechselversuchs gab untenstehendes Resultat.

Ratte	Säurelös. P mg-%	Serumkalk mg-%	Sektion
VII ₇	5,5	12,6	Leicht verdickte costochondrale Verbindungen; breite Epiphysenlinien, weiche Knochen.
VII ₈	5,4	12,9	Leicht verdickte costochondrale Verbindungen; recht breite Epiphysenlinien, weiche Knochen.

Es geht hieraus hervor, daß das zwölf-tägige Verbleiben auf der *Mc Collum*-Kost hinreichte, ausgesprochene Veränderungen hervorzurufen, sowohl von pathologisch-anatomischer Art wie bezüglich des säurelöslichen P, der auf das gleiche niedrige Niveau herabsank, wie man früher bei der experimentellen Rachitis beobachtet hatte.

Diese Untersuchung des Phosphor- und Calciumstoffwechsels bei Rattenjungen, deren Kost man entweder bezüglich ihres P- oder ihres Ca-Gehalts änderte, ist interessant mit gewissen entsprechenden Untersuchungen von anderer Seite zu vergleichen. *Scheunert, Schattke und Weise* (4) zeigten, daß man bei Pferden eine negative Ca-Balance sah, wenn die Kost Ca-arm wurde, aber dauernd reichlich P enthielt. Gleichzeitig nahm die P-Ausscheidung mit den Fäzes ab, während sie dagegen im Urin anstieg. *O. Bang* (5) hat ähnliche Versuche auch an Pferden vorgenommen. Er konnte konstatieren, daß Pferde bei Kleiekost, die relativ sehr viel P, aber wenig Ca enthält, in negativer Ca-Balance waren, die jedoch positiv wurde, wenn man Calciumcarbonat zur Kost hinzufügte. Diese Pferdeversuche werden durch einige von *Telfer* (6) an Hundewelpen vorgenommene Versuche bestätigt. Diese Tiere zeigten bei einer Ca-armen, P-reichen Kost Anzeichen gewisser Hemmungen der Ca-Ablagerung und des Wachstums des Knochensystems. Setzte er Calciumlaktat zur Kost hinzu, so fielen diese Hemmungen fort; die Knochenasche stieg an Menge schnell an und es traten charakteristische Veränderungen des P- und Ca-Stoffwechsels ein. Die Ca-Ausscheidung stieg sowohl im Urin als auch in den Fäzes, während die P-Ausscheidung mit den Fäzes stieg und die P-Ausscheidung im Urin abnahm, ein Befund, den auch *Briggs* (7) bestätigt hat.

Es könnte nach diesen Versuchen aussehen, als ob ein Überschuß von P in der Kost die Ca-Resorption hinderte, eventuell dadurch, daß er in den Fäzes Ca an sich bindet. Doch könnte man ebenso gut denken, daß sowohl P als auch Ca in den oberen Darmabschnitten reichlich resorbiert

wurde, worauf dann weiter unten im Darmkanal eine Wiederausscheidung von P stattfand, wodurch auch Ca zur Ausscheidung gebracht wurde. In beiden Fällen bekäme man eine Erklärung dafür, daß ein Überschuß von P in der Kost eine geringere Ca-Retention verursachte.

Die umgekehrten Verhältnisse gehen aus den hier mitgeteilten Rattenversuchen hervor. Bei diesen war die Kost Ca-reich, aber relativ P-arm. Durch Besserung dieses Mangels in der Kost erzielte man eine Besserung der Retention von P und Ca. Im ersten Falle (A) kam ein Ausgleich dadurch zustande, daß man Phosphate zur Kost hinzufügte. Dadurch stieg die P-Ausscheidung sowohl im Urin als auch in den Fäzes; die Ca-Ausscheidung mit den Fäzes stieg darauf, während die Ca-Ausscheidung im Urin stark abnahm. Nach *Bergeims* (8) Untersuchungen über die Ca-Resorption bei Ratten auf derselben wie hier angewendeten Kost liegen auch hier zwei Möglichkeiten vor. Entweder ist die primäre Ca-Resorption in den oberen Darmabschnitten infolge der Phosphatvermehrung in der Kost verringert worden, oder auch es ist die Ca-Ausscheidung in den unteren Darmabschnitten größer geworden. Selbstverständlich ist auch eine Vereinigung dieser zwei Möglichkeiten denkbar.

Die starke Herabsetzung der Ca-Ausscheidung im Urin muß sicher auf Grund der Verhältnisse bei der P-Retention verstanden werden: Das im Blute zirkulierende Ca kann in den Knochen nicht abgelagert werden, weil P zur Bildung der phosphorsauren Knochensalze fehlt. Durch die vermehrte P-Retention ist diesem Mangel abgeholfen. Es sind nun Möglichkeiten für eine schnelle Ablagerung von Ca vorhanden.

Im zweiten Falle (B) nahm man den Ausgleich dadurch vor, daß man die Kost um die Hälfte ihres Ca-Gehalts beraubte. Wie beschrieben, besserten sich auch hierdurch die Retentionsverhältnisse. Der Grund hierfür war sowohl für P als auch für Ca, daß sie in geringerer Menge mit den Fäzes ausgeschieden wurden. Wenn man annimmt, daß der Ca-Überschuß in der Kost die direkte Ursache dafür war, daß die P-Retention vor der Koständerung gering war, so ist es klar, daß die Herabsetzung der P-Ausscheidung mit den Fäzes die Folge der Koständerung werden mußte. Daß auch die Ca-Retention größer wurde, kann man dadurch erklären, daß die Ca-Ausscheidung in den unteren Darmabschnitten geringer geworden ist, weil das in den oberen Darmabschnitten resorbierte Ca mit dem resorbierten P abgelagert wurde oder aus einem anderen Grunde sich der Ausscheidung entzieht.

Der dritte Versuch (C) zeigte, wie erwähnt, das gleiche, wie der vorhergehende, nur war die Zeitfolge eine andere. Die Koständerung, die durch Zusatz von Ca zur Kost stattfand, bewirkte eine größere

P-Ausscheidung mit den Fäzes wodurch die P-Retention herabgesetzt wurde.

Durch Vergleich dieser Stoffwechseländerungen mit denen, die man als Folge der Einwirkung von ultraviolettem Lichte und Lebertran beobachtete, wird einem sofort klar, daß man diese letzteren jedenfalls der Änderung nicht an die Seite stellen kann, die im Stoffwechsel stattfand, wenn P zu der relativ P-armen Kost gesetzt wurde. Durch den P-Zusatz besserte sich die Ca-Retention dadurch, daß von der resorbierten Menge, die nach der Koständerung etwas herabgesetzt war, mehr im Organismus zurückgehalten wurde. Durch Behandlung mit ultraviolettem Lichte und Lebertran wurde die Ca-Resorption erhöht, während die Ausscheidung im Urin nicht abnahm. Dagegen waren die Veränderungen in den Stoffwechselprozessen anscheinend die gleichen, mochte man nun die Ratten bei der relativ P-armen Kost mit Licht und Lebertran behandeln, oder mochte man die Kost dadurch ändern, daß man sie weniger Ca-reich machte. In beiden Fällen erhöht sich die P- und Ca-Retention, und die erhöhte Retention kam durch eine größere Resorption zustande. Doch soll hier darauf aufmerksam gemacht werden, daß man einen Unterschied auf einem anderen Gebiet fand. Es zeigte sich durch Untersuchung des Bluteserums der Tiere, daß durch diese Behandlungen, unter denen sich die Retentionsverhältnisse besserten, der herabgesetzte säurelösliche P zu normalen Werten anstieg. Dagegen hatte die Licht- und Lebertranbehandlung den Einfluß auf den Serulkalk, daß er über die vorher normalen Werte gebracht wurde. Diesen Einfluß hatte die Koständerung nicht.

Die Frage, wieweit diese Stoffwechseluntersuchungen, speziell die unter C besprochenen, zu näherem Verständnis der Pathogenese der experimentellen Rattenrachitis beitragen können, muß verneinend beantwortet werden. In den zuletzt besprochenen Stoffwechselversuchen wurde eine nicht-rachitogene Kostform dadurch rachitisbewirkend gemacht, daß man so viel Calciumcarbonat hinzusetzte, daß sie dieselbe Zusammensetzung wie *Mc Collums* bekannte Rachitiskost Nr. 3143 bekam. Man wußte von vornherein, daß das Verhältnis zwischen dem P- und Ca-Gehalt der Kost für das Entstehen experimenteller Rachitis eine bedeutende Rolle spielt, so daß ein hoher Wert von Ca : P ihr Auftreten begünstigt. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Veränderung des Verhältnisses Ca : P stark in die Stoffwechselprozesse eingreift; besonders sieht man, daß, wenn das Verhältnis durch Ca-Zusatz größer gemacht wird, die P-Retention kleiner wird, aber darüber hinaus kann man mit Sicherheit nichts sagen, und speziell nicht, weshalb die Veränderung zum Eintreten von Rachitis führen sollte.

Es folgt eine Übersichtstabelle über die gefundenen Zahlen.

		Gew.-Verm. pro Tag g	P-Retent. pro Tag mg	Ca-Retent. pro Tag mg ^{0/0}	Säurelös. P mg ^{0/0}	Serumkalk mg ^{0/0}
--	--	----------------------------	----------------------------	--	----------------------------------	--------------------------------

*Kost Nr. 3143.**Kontrolltiere.*

III ₁	Vorperioden . . .	1,0	3,0	4,4	6,8	12,1
	Nachperioden . . .	1,0	3,1	3,9		
III ₂	Vorperioden . . .	1,8	6,8	8,1	verl. geg.	13,2
	Nachperioden . . .	1,4	5,6	4,6		

Phosphatzusatz.

III ₇	Vorperioden . . .	1,5	5,7	15,2	9,8	11,7
	Nachperioden . . .	2,2	13,7	28,1		
III ₈	Vorperioden . . .	1,1	5,1	9,9	10,8	11,8
	Nachperioden . . .	1,3	10,9	24,2		

Kontrolltiere.

IV ₁	Vorperioden . . .	0,8	6,6	15,0	6,5	12,9
	Nachperioden . . .	1,3	8,0	13,8		
IV ₂	Vorperioden . . .	1,4	7,1	14,6	5,6	12,6
	Nachperioden . . .	1,2	4,0	8,7		

Kalkabzug.

IV ₆	Vorperioden . . .	1,5	7,5	13,6	8,6	12,0
	Nachperioden . . .	2,5	13,9	16,6		
IV ₇	Vorperioden . . .	1,1	7,3	9,0	11,7	12,2
	Nachperioden . . .	2,3	15,3	20,8		

*Modifizierte Kost Nr. 3143 (nicht rachitogen).**Kontrolltiere.*

VII ₁	Vorperioden . . .	1,9	11,4	17,8	8,6	11,8
	Nachperioden . . .	1,8	9,7	17,3		
VII ₂	Vorperioden . . .	2,8	14,8	21,1	10,6	12,7
	Nachperioden . . .	2,1	16,1	26,3		

Kalkzulage.

VII ₇	Vorperioden . . .	2,8	13,5	19,1	5,5	12,6
	Nachperioden . . .	1,7	5,4	20,6		
VII ₈	Vorperioden . . .	2,5	13,3	7,2	5,4	12,9
	Nachperioden . . .	1,5	8,5	8,5		

Zusammenfassung.

Der P- und Ca-Stoffwechsel wurde bei Rattenjungen untersucht, die eine Kost bekamen, deren Gehalt an P und Ca während des Versuchs geändert wurde; die Änderung fand statt, nachdem die Tiere in zwei Perioden zu 4 Tagen auf der ursprünglichen Kost gewesen waren. Nach der Änderung wurde der Stoffwechsel in drei Perioden zu je 4 Tagen untersucht. Im ganzen wurden drei Versuche angestellt. In den zwei ersten Versuchen (A und B) wurde die *Mc Collumsche* Kost Nr. 3143 benutzt, die teils durch Phosphatzusatz und teils durch Ca-Abzug geändert wurde. Im dritten Versuch (C) wurde eine modifizierte *Mc Collum-Kost* gegeben, die 1,2 anstatt 3 Teile Calciumcarbonat

enthält. Diese Kost wurde zu der nicht-modifizierten *Mc Collum*-Kost geändert.

1. Ein Zusatz von Phosphaten zur Ca-reichen, relativ P-armen *Mc Collum*-Kost Nr. 3143 bewirkte, daß sowohl die P- als auch die Ca-Retention bedeutend anstieg. Die größere P-Retention beruhte auf einer größeren Resorption, während die vermehrte Ca-Retention ihre Ursache in einer verminderten Ca-Ausscheidung im Urin hatte. Die Ca-Ausscheidung in den Fäzes stieg etwas. Die Koständerung brachte die rachitischen Veränderungen zum Schwinden und den säurelöslichen P zum Anstieg auf Normalwerte. Der Serumkalk blieb unverändert.

2. Abzug von Calciumcarbonat bei der gleichen Kost rief gleichfalls eine Steigerung sowohl der P- als auch der Ca-Retention hervor. Sowohl beim P als auch beim Ca beruhte diese Steigerung auf einer erhöhten Resorption. Die rachitischen Veränderungen gingen stark zurück, und der säurelösliche P stieg auf den normalen Wert an. Beim Serumkalk trat keine Veränderung ein.

3. Die Änderung der modifizierten (nicht rachitogenen) *Mc Collum*-Kost zur Kost Nr. 3143 setzte die P-Retention durch Verursachung einer größeren P-Ausscheidung mit den Fäzes herab. Die 12 Tage bei *Mc Collums* Kost Nr. 3143 genügten, um rachitische Veränderungen bei den Tieren hervorzurufen und den säurelöslichen P stark herabzusetzen. Der Serumkalk wurde nicht wesentlich beeinflusst.

Literatur.

1) E. V. *Mc Collum*, Newer knowledge of nutrition, 2nd ed. New York 1923. — 2) A. F. Hess, L. J. Unger und A. M. Pappenheimer, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 19, 8, 1921. — 3) H. Aron u. R. Sebauer, diese Zeitschr. 8, 1, 1908. — 4) A. Scheunert, A. Schattke und M. Weise, ebendasselbst 189, 10, 1923. — 5) O. Bang, Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles Aarsskrift. København 1925. — 6) S. V. Telfer, Quart. Journ. Med. 17, 245, 1924. — 7) A. P. Briggs, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 23, 137, 1925. — 8) O. Bergeim, Journ. Biol. Chem. 120, 51, 1926.

Methode zur Bestimmung der lipolytischen Wirkung von Pankreassaft und Blut.

Von

Nikolaus Wwedensky und P. J. Dobrowitzky (Moskau).

(Aus dem Laboratorium für experimentelle Biologie der
Swerdlow-Universität und aus dem physiologischen Laboratorium der
Krupskaya-Akademie.)

(Eingegangen am 14. Juli 1927.)

Mit 12 Abbildungen im Text.

Gegen die von *Rona*¹ empfohlene und angewandte Methode zur Bestimmung der lipolytischen Eigenschaften von Pankreassaft und Blut läßt sich eine ganze Reihe sehr wesentlicher Einwände erheben. In erster Linie wird der Effekt der lipolytischen Wirkung von Pankreassaft und Blut nach der Methode *Ronas* bei Temperaturen, die bedeutend unter dem Optimum der Fermentwirkung liegen, bestimmt. Außerdem liegt, wie das aus der weiter unten angeführten Temperaturkurve, $\sigma = f(t)$, (Abb. 1) für eine gesättigte Tributyrinlösung ersichtlich ist, das Temperaturmaximum der Oberflächenaktivität^{2 3} fast bei 18° C, der Temperaturkoeffizient $\left(-\frac{d\sigma}{dt}\right)$ besitzt aber in den Grenzen von 0 bis 20° seine höchsten Werte.

Tabelle I.

Veränderung der Oberflächenspannung einer gesättigten Tributyrinlösung mit der Temperatur.

t°:	0,0	10,0	20,0	40,0	60,0	80,0	100,0
Reines Wasser . $\sigma =$	75,90	74,20	72,70	69,45	66,10	62,82	59,60 erg/qcm
Gesättigte Tributyrin- lösung $\sigma =$	53,40	50,71	48,03	46,50	43,69	46,50	—

¹ P. Rona und L. Michaelis, diese Zeitschr. 31, 345, 1911; E. Abderhalden, Handb. d. biol. Arbeitsmethod. 1915.

² P. Reh binder, Journ. f. prakt. Phys. 1, 1 bis 4, 1924 (russ.); Zeitschr. f. phys. Chem. 3, H. 5/6. Es ist die Bedeutung der Oberflächenaktivität für Lösungen behandelt worden.

³ N. Wwedensky, Journ. f. exper. Biol. u. Med., Nr. 14, 1927; diese Zeitschr. 188, 270, 1927. Für physiologische Flüssigkeiten.

Tabelle II.

Der Temperaturkoeffizient ($-\frac{d\sigma}{dt}$) einer gesättigten Tributyrinlösung.

Temperatur:	5°	10°	15°	20°	25°	30°	40°	50°
$-\frac{d\sigma}{dT}$	0,25	0,25	0,25	0,25	0,12	0,12	0,12	0,12

Die Verschiebungen der absoluten Werte der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von den Temperaturbedingungen allein können daher genügend groß sein und müssen einen Vergleich der verschiedenen Versuche bedeutend erschweren. Das hat eine um so größere Bedeutung, da *Rona* die Temperaturbedingungen seiner Versuche nicht genau angibt¹ und nur allgemein von Zimmertemperatur spricht.

Endlich aber ist die Methode einer Bestimmung der Oberflächenspannung mittels des Stalagmometers in seiner vereinfachten Form durchaus unbefriedigend.

Wir wissen, daß bei stalagmometrischen Messungen das Gewicht eines Tropfens nicht proportional der Oberflächenspannung und daß also, wie man es gewöhnlich annimmt, die Tropfenzahl nicht umgekehrt proportional der Oberflächenspannung ist. Das gegenseitige Verhalten dieser Größen ist viel komplizierter, und zwar ist (*Lonslein, Harkins*²)

$$q = 2\pi r \sigma f(r/a);$$

wo $a = \sqrt{\frac{2\sigma}{d}}$ ist; hier ist q das Gewicht eines Tropfens, r der Radius der Stalagmeterspitze, σ = die Oberflächenspannung der Lösung, d die Flüssigkeitsdichte, $f(r/a)$ eine gewisse, für jedes Stalagmeter durch besondere Versuche zu bestimmende empirische Funktion.

Somit wird die ganze Berechnung außerordentlich kompliziert und findet bei gewöhnlichen Bestimmungen keine Berücksichtigung. Außerdem läßt man völlig außer acht, daß die Arbeiten einer ganzen

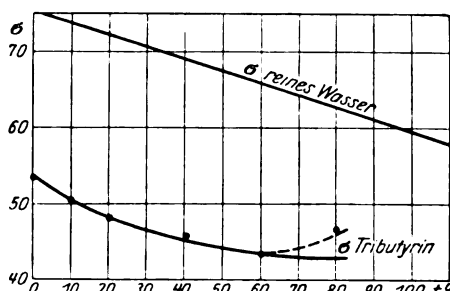


Abb. 1.

¹ *Rona* läßt Abweichungen von 4 bis 5° C zu (*Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethod.* 1915, S. 303.

² *Harkins, Journ. Amer. Chem. Soc.* 42, 700, 1920.

Reihe von Autoren (*Antonow*¹, *Harkins*², *Morgan*³ u. a.) in erschöpfender Weise die stalagmometrische Methode kritisiert und ihre Unanwendbarkeit für Lösungen oberflächenaktiver Stoffe (*P. Reh binder*⁴), infolge des Verdunstungseffekts an der Oberflächenschicht, nachgewiesen haben. Zu solchen Stoffen gehört aber gerade eine Tributyrinlösung.

Die Kurve auf Abb. 1 zeigt sogar, daß der letzte Punkt bei 80°, offenbar infolge der Verdunstung, etwas höher liegt.

Noch mehr ist gegen die stalagmometrische Methode in der Modifikation *Ronas* einzuwenden, da die Bedingungen der Stalagmometerspitze (*Antonow*) bei der verhältnismäßig großen Zahl ausstehender Tropfen (80 bis 90 Tropfen in der Minute) nicht berücksichtigt werden.

Alle diese erwähnten Überlegungen haben uns veranlaßt, uns der von *P. Reh binder*⁵ ausgearbeiteten, wirklich vorzüglichen Methodik zur Messung der Oberflächenspannung von Lösungen oberflächenaktiver Stoffe zu bedienen. Mit Bezugnahme auf diese Methodik haben wir die weiter unten angeführte Methode zur Bestimmung der lipolytischen Eigenschaften von Pankreassaft und Blut ausgearbeitet.

I. Methodik.

Allgemeine Bemerkungen.

Wir haben uns des von *P. Reh binder*⁶ konstruierten Apparats zur Messung der Oberflächenspannung an der Grenze Flüssigkeit (Dampf, Luft) bedient. Der Meßzylinder mit der zu untersuchenden Flüssigkeit wurde in einem elektrischen Thermostaten untergebracht, und die Spaltung des Tributyrins fand bei 40° C statt.

Die Meßvorrichtungen und der Quecksilberaspirator befanden sich außerhalb des Thermostaten und waren durch Gummischläuche mit dem Meßzylinder verbunden. Die Messungen wurden alle 5 oder 10 Minuten vorgenommen.

II. Bestimmung der lipolytischen Wirkung des Pankreassaftes.

Der Pankreassaft stammte von einem nach der *J. P. Pawlowschen* Methode operierten Hunde und wurde mit Darmsaft (0,1 cem), den wir von einem Hunde mit einer Thiry-Vella-Fistel erhielten, aktiviert. Der aktivierte Pankreassaft wurde vor der Verdünnung durch ein Faltenfilter filtriert. Vorher waren verschiedene Verdünnungen des Saftes ausprobiert worden, und darauf wurde eine solche Verdünnung gewählt, die an und

¹ *Antonow*, Über die Grenzflächenspannung von zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten im Gleichgewichtszustande. Diss. (russ.) St. Petersburg 1914.

² l. c.

³ *Morgan*, Zeitschr. f. phys. Chem. 77, 1911; 78, 1912.

⁴ *P. Reh binder*, ebendasselbst 111, 449, 1924.

⁵ l. c.

⁶ *P. Reh binder*, diese Zeitschr. 187. 32, 1927; Genauerer darüber siehe Journ. f. exper. Biol. u. Med. Nr. 14, 1927.

für sich gleich bei ihrem Zusatz zu einer Tributyrinlösung keine Veränderung der Größe der Oberflächenspannung und außerdem auch keine augenblickliche Zersetzung des Tributyrins hervorruft.

Tabelle III.

Tributyrinzersetzung bei verschiedenen Verdünnungen des Pankreassaftes;
Oberflächenspannung in absoluten Einheiten (in Erg/qcm).

Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
Zeit	σ	Zeit	σ	Zeit	σ	Zeit	σ
1h 2'	64,79	3h 17'	56,08	11h 47'	51,39	5h 10'	53,40
1 9	66,80	3 22	56,08	11 49	51,39	5 15	56,08
1 15	66,80	1 15	62,78	11 57	53,40	5 20	56,08
1 22	67,47	1 22	63,40	12 7	55,41	5 25	56,08
1 30	68,14	1 30	64,10	12 20	57,32	5 30	57,42
1 39	68,14	1 39	66,80	12 35	58,09	5 39	57,42
1 49	68,81	1 49	66,80	12 49	58,09	5 44	58,76
2 2	69,48	—	—	—	—	6 00	58,76
Gesätt. Lsg. Tributyrin	52,06	Gesätt. Lsg. Tributyrin	49,4	Gesätt. Lsg. Tributyrin	51,39	Gesätt. Lsg. Tributyrin	50,71
t	14^0	t	14^0	t	14^0	t	14^0
1 : 30		1 : 1000		1 : 3000		1 : 5000	

Wie aus dem Versuch hervorgeht, erweist sich eine 3000fache Verdünnung des Pankreassaftes als die beste.

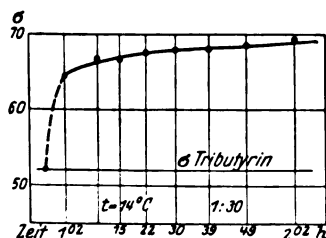


Abb. 2.

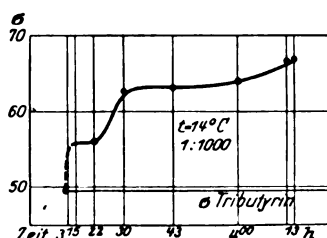


Abb. 3.

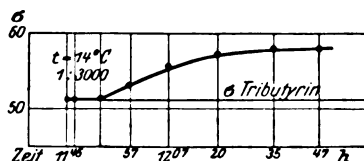


Abb. 4.

Wir haben eine Verdünnung des Saftes von 1 : 3000 gewählt. Zu dem Zwecke nahmen wir 1 ccm filtrierten und aktivierten Pankreassaft und verdünnten ihn zunächst 300mal, worauf wir 1 ccm dieser Lösung zu 9 ccm einer gesättigten Tributyrinlösung hinzufügten und somit eine 3000fache Verdünnung erhielten. Die Tributyrinlösung wurde auf gewöhnlichem Wege hergestellt. Zu 90 ccm Wasser und 10 ccm Puffer-

gemisch nach *Clark*¹ ($p_H = 7.6$) wurde 0,1 ccm Tributyrin, Marke B. D. H.², hinzugefügt. Nach halbstündigem Schütteln wurde eine Sättigung der Lösung erreicht. Hierauf wurde die Lösung filtriert, und die ersten und letzten Portionen des Filtrats wurden fortgegossen.

Nach Herstellung der nötigen Lösungen wurde der Apparat geladen und zunächst die Oberflächenspannung der gesättigten Tributyrinlösung bei 40° C gemessen. Darauf wurde zu 9 ccm der auf 40° C erwärmten Tributyrinlösung 1 ccm der Lösung, 1:3000, des Pankreassaftes hinzugefügt und sofort die Messung der Oberflächenspannung des Gemisches vorgenommen.

Im weiteren wurden während einer Stunde alle 5 oder 10 Minuten Messungen der Oberflächenspannung der durch den Pankreassaft bis 40° C zersetzten Tributyrinlösung vorgenommen.

Wie aus den unten angeführten Kurven ersichtlich, geht die Zersetzung des Tributyrins bei Verdünnung des Pankreassaftes 1:3000 gleichmäßig vonstatten, und die Punkte des Versuchs lagern sich in der Nähe der Kurve oder auf ihr selbst.

Vergleichen wir jedoch die Tributyrinzersetzung bei 40° C und 17° C, so finden wir, daß der Prozeß im zweiten Falle bedeutend verzögert ist.

Tabelle IV.

Tributyrinzersetzung durch Pankreassaft. Oberflächenspannung in Erg/qcm.

Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
Zeit	σ	Zeit	σ	Zeit	σ	Zeit	σ
10h17'	50,72	2h13'	50,72	4h38'	46,0	6h22'	52,0
10 25	54,74	2 20	53,20	4 45	52,0	6 32	55,0
10 45	58,76	2 33	54,74	4 55	53,0	6 42	56,0
11 00	62,78	2 44	58,76	5 5	54,0	6 52	57,0
11 5	62,78	2 53	38,36	5 15	55,5	7 2	59,0
11 15	62,78	3 00	60,10	5 25	57,0	7 12	59,0
11 30	62,78	3 10	61,43	5 35	58,0	7 22	59,0
—	erg/qcm	—	erg/qcm	—	erg/qcm	7 32	59,0
Gesätt. Lsg. Tributyrin	48,04	Gesätt. Lsg. Tributyrin	50,72	Gesätt. Lsg. Tributyrin	45,0	Gesätt. Lsg. Tributyrin	52,0
t	40°	t	17°	t	40°	t	17°

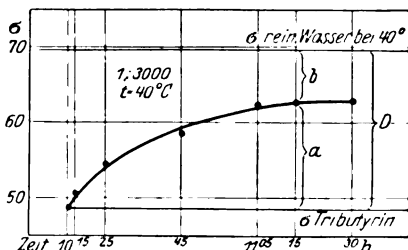


Abb. 5

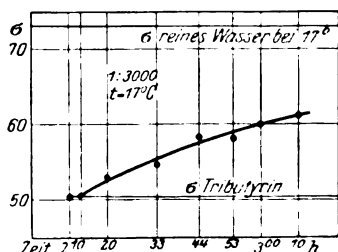


Abb. 6.

¹ 50 ccm 0,1 M. H_2PO_4 + 43 ccm n/10 NaOH.

² Herrn Dr. P. Rehinder spreche ich hier für liebenswürdige Überlassung von Tributyrin meinen besten Dank aus. N. Wwedensky.

Die mit Zersetzung des Tributyrins beim Stehen im Verlauf einer Stunde im Thermostaten bei 90° C angestellten Kontrollversuche zeigen, daß diese Zersetzung praktisch ganz unbedeutend ist.

Tabelle V.

Einfluß einer Temperatur von 40° C auf die Zersetzung des Tributyrins. Die Bedeutung des Puffergemisches erklärt sich aus dem weiter unten angeführten Versuche.

Zeit:	2h30'	2h40'	2h50'	3h	3h10'	3h20'	3h30'	t
Gesätt. Lsg. Tributyrin . σ =	50,72	51,96	51,96	52,02	52,02	52,02	52,02 erg/qcm	40°

Tabelle VI.

Einfluß des Puffergemisches nach Clark auf die Tributyrinzersetzung. Zersetzung ohne Puffer.

Zeit:	3h50'	4h	4h07'	4h17'	4h27'	4h37'	4h57'	Tributyrin	t
σ =	50,72	51,96	51,96	52,02	52,02	52,02	53,0	50,72 erg/qcm	40°

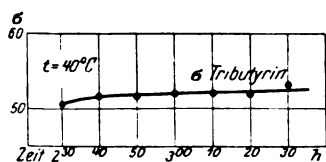


Abb. 7.

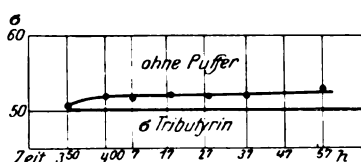


Abb. 8.

Somit ist beim Fehlen eines Puffers die Zersetzung des Tributyrins durch den Pankreassaft durchaus unbedeutend.

Fügt man zu einer gesättigten Tributyrinlösung 1 ccm verdünnten Pankreassaft (1 : 3000) oder einfach Wasser hinzu, so wird die Oberflächenspannung der Lösung ebenfalls nicht verändert.

Wenn wir die nach der Methode Ronas erhaltene Kurve der Tributyrinzersetzung mit diesen Kurven vergleichen, so sehen wir, daß sie nicht zusammenfallen. Die Zahl der aus der Ronaschen Pipette austretenden Tropfen nimmt schneller ab, als die im Rehbinderschen Apparat gemessene Oberflächenspannung zunimmt.

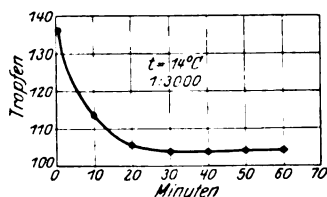


Abb. 9.

Anfangs haben wir bereits erwähnt, daß die Oberflächenspannung dem Tropfengewicht nicht proportional ist. Die Verdampfungsbedingungen wie auch die Reaktionswirkung, die in der Probe selbst während des Austropfens des Gemisches der Tributyrin- und Pankreas-saftlösung vor sich geht, bleiben ebenfalls nicht ohne Einfluß.

III. Bestimmung der lipolytischen Wirkung des Blutes.

Zur Bestimmung der lipolytischen Wirkung des Blutes haben wir uns menschlichen Serums bedient.

Die Bestimmungsmethode selbst ist hierbei ihrem Wesen nach eine Mikromethode.

Zur Blutentnahme wird mit der *Frankeschen* Nadel ein Stich in den Finger gemacht und etwa 0,2 ccm Blut in eine schmale Glasröhre angesaugt. Die Enden der Röhre werden mit Mendelejewkitt verschlossen, und das Blut kommt auf 30 Minuten in den Thermostaten. Eine Stunde nach Gerinnung des Blutes kann man bereits die nötige Serummenge erhalten. Auf Grund unserer Versuche nahmen wir zur Messung der lipolytischen Tätigkeit des Blutes 40 cmm Serum mittels einer 20 cmm Mikropipette. Die 40 cmm Serum wurden in 0,5 ccm einer gesättigten Tributyrinlösung mit Puffergemisch ($p_H = 7,6$) aufgelöst und sogleich in den Meßzylinder zu 4,5 ccm einer gesättigten und auf 40° C erwärmten Tributyrinlösung (mit Puffergemisch) gegeben. Sofort wurde die Oberflächenspannung gemessen. Die weiter unten angeführten Daten zeigen, daß die Spaltung des Tributyrins durch die Blutlipase gleichmäßig vor sich geht und in einigen Fällen nach 70 Minuten ihren Grenzwert erreicht.

Tabelle VII.

Tributyrinzersetzung durch Blutlipase. Oberflächenspannung in Erg/qcm.

Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
Zeit	σ	Zeit	σ	Zeit	σ	Zeit	σ	Zeit	σ	Zeit	σ
4h28'	50,08	5h 1'	51,01	2h55'	49,68	11h40'	52,43	2h10'	52,91	4h20'	52,91
4 40	50,08	5 12	52,91	3 5	51,01	11 50	54,44	2 20	55,38	4 30	54,44
5 00	51,92	5 20	54,81	3 15	52,91	12 00	56,33	2 30	56,71	4 40	55,38
5 20	57,66	5 30	56,71	3 25	54,81	12 10	58,24	2 40	58,24	4 50	55,38
5 40	62,03	5 40	58,61	3 35	56,71	12 20	60,14	2 50	59,56	5 00	56,33
6 00	65,26	5 50	60,51	3 45	58,61	12 30	60,51	3 00	60,51	5 10	57,28
6 20	65,26	6 00	61,46	3 55	60,51	12 40	61,46	3 10	62,03	5 20	58,24
		6 10	62,41	4 5	62,41	12 50	62,41	3 20	63,36	5 30	60,14
		6 20	64,31	4 15	62,41	1 00	63,92	3 30	63,36	5 40	60,14
		6 30	64,31	4 25	62,41	1 10	63,92	3 40	63,36	5 50	60,14
		6 40	64,31	4 35	62,41	1 20	63,92	3 50	63,36	6 00	60,14
		6 50	64,31	4 45	62,98	1 30	63,92	4 00	63,36	6 10	60,14
		7 00	64,31	4 55	62,98	1 40	63,92				
6h25'	49,68	7h10'	49,68	5h15'	51,58	1h50'	51,58	4h 5'	51,58	6h15'	51,58

Kontrollmessungen einer gesättigten Tributyrinlösung zeigen nach zweistündigem Stehen im Thermostaten bei 40° C keine Veränderung der Oberflächenspannung der Lösung. Bei längerem Stehen des Tributyrins im Thermostaten bei 40° C, z. B. während 18 Stunden, beobachten wir eine völlige Zersetzung des Tributyrins oder richtiger eine Zunahme der Oberflächenspannung der Lösung, die infolge einer Verdunstung der Substanz aus der Oberflächenschicht stattfindet.

Ein Zusatz von Puffergemisch zur Tributyrinlösung hat ebenfalls, wie auch bei der Pankreassaftlipase, eine große Bedeutung. Dies zeigt der angeführte Versuch einer Spaltung des Tributyrins mit 40 cmm Serum ohne Puffergemisch.

Tabelle VIII.

Tributyrinzersetzung durch Blutlipase ohne Puffergemisch.

Zeit:	2h10'	2h20'	2h30'	2h40'	2h50'	3h	3h10'	3h20'	3h30'	3h40'	3h50'	4h	4h10'
σ =	49,68	50,06	51,06	51,97	52,43	52,43	52,43	52,43	52,43	52,43	52,43	52,43	52,43

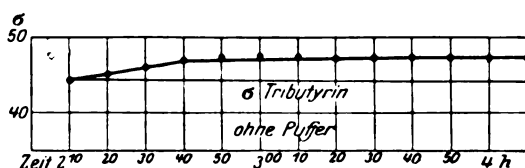


Abb. 10.

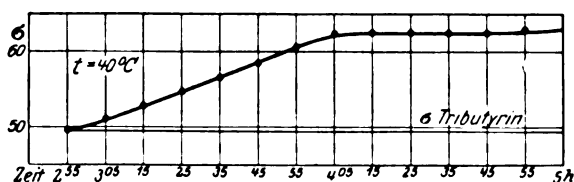


Abb. 11.

Schlußfolgerungen.

Auf die Vorzüge der vorgeschlagenen Methode ist schon im Texte hingewiesen worden. Zu dem bereits Gesagten ist noch hinzuzufügen, daß die Bestimmung selbst mit diesem Apparat außerordentlich einfach ist und keine so mühsame Arbeit, wie sie das Ablesen der Tropfen erfordert, darstellt. Außerdem sind bedeutende Fehler beim Ablesen der Tropfenbruchteile ausgeschlossen. Endlich haben wir die Möglichkeit, die Kinetik des Fermentationsprozesses genau zu untersuchen, da unsere Messungen dem Augenblick der Ablesung genau entsprechen. Bei der stalagmometrischen Methode haben wir stets ein gewisses Zeitintervall, bis die zwischen den Marken zu messende Tropfenzahl

ausfließt. In dieser Zeit kann die Zersetzung weiter fortschreiten, und die Kinetikkurve wird unvermeidlich verschoben.

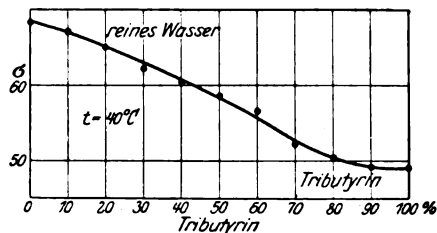


Abb. 12.

Am schwierigsten ist die Frage des quantitativen Vergleichs zweier Versuchsergebnisse, insofern die Kurve der Tributyrinzersetzung durch Lipase nicht genügend erforscht ist. Man kann von der allgemeinen Vorstellung ausgehen, daß sich die Kurve der Oberflächenspannung der Lösung um so mehr der des Wassers nähert, je mehr Tributyrin zersetzt ist. Nach der Konzentrationskurve des Tributyrins läßt sich annähernd die Menge des nicht zersetzten Tributyrins in prozentualen Verhältnis zu der gesättigten Lösung eines beliebigen Stoffes beurteilen. Da dies jedoch schwierig ist, so beurteilen wir hier die lipolytische Wirkung, indem wir verschiedene Punkte der Kurven, die sich auf gleiche Zeitintervalle beziehen, miteinander vergleichen. Dabei kann man die zu vergleichenden Werte auf das Maximum der Tributyrinzersetzung durch eine gegebene Saft- oder Serumlösung beziehen. Da wir in dem Koordinatensystem, in welchem unsere Kurve der Tributyrinzersetzung bei konstanter Temperatur (40° C) liegt, gleichzeitig von oben eine der Oberflächenspannung reinen Wassers entsprechende Gerade, von unten aber eine der Oberflächenspannung einer gesättigten Tributyrinlösung entsprechende Gerade ziehen können, so kann diese Lage für jeden Punkt unserer Kurve der Tributyrinzersetzung durch die Abschnitte a oder b (s. Abb. 5), welche zusammen die Größe D ergeben, bestimmt werden. Diese Größe D ist der völligen Depression der Oberflächenspannung von Wasser durch Tributyrin in einer gesättigten Lösung gleich.

Für zwei beliebige Kurven ist die Größe D eine konstante, und daher ist:

$$a + b = D$$

$$a_1 + b_1 = D$$

woraus:

$$a + b = a_1 + b_1.$$

Als Maß der lipolytischen Wirkung können wir den Abschnitt a , den wir mit $\Delta\sigma_{\max}$ bezeichnen, nehmen, da er die Ordinatendifferenz

der Oberflächenspannung der im gegebenen Augenblick zersetzten Tributyrinlösung und der Oberflächenspannung einer gesättigten Tributyrinlösung, bezogen auf das Maximum der Tributyrinzersetzung, darstellt. Je bedeutender diese Größe ist, um so relativ stärker ist die lipolytische Wirkung von Saft und Blut.

Somit ist im Versuch 1 $\Delta\sigma_{\max} = 14 \text{ Erg/qcm}$, im Versuch 3 aber (s. Tabelle IV) nach Verlauf derselben Zeit (48 Minuten) $= 12 \text{ Erg/qcm}$. Dieses Maximum im Versuch 3 wurde erst nach 9 Minuten erreicht. Die lipolytische Wirkung des Pankreassaftes war im zweiten Falle etwas geringer.

Eine bessere Vorstellung kann man erhalten, wenn man $\Delta\sigma = a$ der einzelnen Punkte beider sich auf gleiche Zeitintervalle beziehenden Kurven vergleicht. So erhalten wir z. B. für dieselben Versuche 1 und 3 folgende zwei Reihen:

Tabelle IX.

Versuch 1		Versuch 3	
Minuten	$\Delta\sigma_a$	Minuten	$\Delta\sigma_a$
10	6,0	10	6,0
20	9,0	20	8,0
30	12,0	30	10,0
40	13,5	40	11,0
50	14,0	50	12,0
60	14,0	60	14,0

Die Tributyrinzersetzung beginnt bei beiden Versuchen gleichzeitig, wird dann bei Versuch 3 langsamer und gleicht sich gegen Ende der Versuche aus. Die Resultate der Versuche 1 und 3 stellen individuelle Abweichungen der lipolytischen Wirkung des Pankreassaftes ein und desselben Hundes dar und sind aus dem Grunde nicht so schroff.

Zum Schluß muß noch bemerkt werden, daß Ärzte und Biologen, die in größerem Maßstabe Untersuchungen der Oberflächenspannung anzuwenden beginnen und sich dabei der stalagmometrischen oder kapillaren Messungsmethode bedienen, die von ihnen erhaltenen Resultate in solch relativen Größen wie in der Tropfenzahl oder in prozentualen Verhältnissen ausdrücken, während sich der Physiker schon lange der absoluten Größe zur Messung der Oberflächenspannung in Erg/qcm bedient. Drücken wir aber unser Resultat in Tropfenzahl aus, so müssen wir uns stets vergegenwärtigen, daß während die Tropfenzahl zunimmt, die Oberflächenspannung der Flüssigkeit in der Tat abnimmt. Daher wäre es äußerst wünschenswert, sich der allgemein angenommenen absoluten Werte der Oberflächenspannung in Erg/qcm zu bedienen.

Zusammenfassung.

1. Es sind die lipolytischen Wirkungen des Pankreassaftes und Blutes nach der Maximalblasendruckmethode bei verschiedenen Temperaturen erforscht.

2. Die Untersuchung der lipolytischen Wirkungen der Verdauungssäfte und des Blutes muß bei einer dem Fermentoptimum entsprechenden Temperatur¹ vorgenommen werden.

3. Die Methode einer Messung der Oberflächenspannung mittels Stalagmometer in seiner Anwendung zur Untersuchung der Fermente ist zu verwerfen.

¹ E. Abderhalden und Lampé (Zeitschr. f. physik. Chem. 78, 1912) und P. Rona (E. Abderhalden, Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. 8, 303, 304, 1915) haben eigene Methoden zur Bestimmung der lipolytischen Fermente bei Körpertemperatur vorgeschlagen. Diese Methodik hat jedoch keine Verbreitung gefunden. Abgesehen von den Unbequemlichkeiten, die sich aus der Methodik der stalagmetrischen Messungen selbst ergeben, müssen Messungen bei hohen Temperaturen noch weniger genau sein.

Über den Einfluß der Verfütterung verschiedener aktiver Eisenverbindungen auf den Verlauf der Avitaminose bei Reistauben.

Von

P. M. Suski (Los Angeles, California).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts
der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 14. Juli 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

D. Banerjee (1) hat kürzlich Untersuchungen aus dem Laboratorium von Professor *Bickel* mitgeteilt, aus denen sich ergibt, daß Reistauben ungefähr gleich lange Zeit nach Beginn der Fütterung mit poliertem Reis und Wasser leben, einerlei, ob man den Reis mit aktivem oder inaktivem *Baudischschem* Eisenoxyd (2) einstäubt. Wenn daraus auch folgt, daß das aktive Eisenoxyd nicht die Vitamine ersetzen kann, so geht doch aus alledem noch nicht hervor, daß das aktive Eisenoxyd völlig einflußlos auf den Verlauf der Avitaminose sei. Ich habe nun, einem Vorschlage von Herrn Professor *Bickel* folgend, diese Untersuchungen von *Banerjee* auf breiterer Basis und in verschiedener Richtung nach neuen Gesichtspunkten in meinem Laboratorium in Los Angeles aufgenommen und will im folgenden kurz über meine Ergebnisse berichten.

Ich arbeitete mit folgenden Eisenverbindungen:

1. Eisencarbonat, hergestellt von *van Eweyk* und *Tennenbaum*, benzidinaktives, aber unmagnetisches Präparat; Dosierung: 10 mg pro Taube täglich.

2. Eisenoxyd, hergestellt nach der *Baudischschen* Methode, benzidinaktives, stark magnetisches Präparat; Dosierung: 5 mg pro Taube täglich.

3. Eisensulfat ($\text{FeSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$), das jedesmal unmittelbar vor der Gabe an die Tiere mit Ultraviolettlicht 30 Minuten bei einer Lampenentfernung von 20 cm in offener Schale bestrahlt worden war und dadurch starke Benzidinaktivität gewonnen hatte; Dosierung: 50 mg pro Taube täglich.

4. Eisensulfat ($\text{FeSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$), das nicht mit Ultraviolettlicht bestrahlt worden war; Dosierung: 50 mg pro Taube täglich.

Ich hatte fünf Gruppen von Tauben, die sämtlich mit poliertem Reis und Wasser bei freiwilliger Nahrungsaufnahme ernährt wurden. Das Eisen wurde den Tieren in Form einer Pille in den Kropf täglich eingeführt. Eine Gruppe („Kontrolle“) meiner Tauben bekam neben dem Reis und dem Wasser täglich die gleiche Menge Pillenmasse wie die Tiere der übrigen Gruppen in den Kropf eingeführt, aber ohne Eisenzusatz.

Gruppe I, Taube 1 bis 9: 10 mg aktives Eisencarbonat pro Tier täglich.

Gruppe II, Tauben 11 bis 19: 5 mg aktives Eisenoxyd pro Tier täglich.

Gruppe III, Tauben 20 bis 28: Pillenmasse ohne Eisen täglich gegeben, „Kontrolle“.

Gruppe IV, Tauben 30 bis 39: 50 mg bestrahltes Eisensulfat pro Tier täglich.

Gruppe V, Tauben 40 bis 48: 50 mg unbestrahltes Eisensulfat pro Tier täglich.

(Der Fe-Gehalt von 10 mg des Eisencarbonats entsprach ungefähr dem Fe-Gehalt von 5 mg des Oxyds.)

Wir betrachten zunächst die Gruppen I, II und III. Wenn man den durchschnittlichen Gewichtssturz jeder Gruppe in Prozentberechnung in Kurven aufzeichnet, dann findet man, daß die Kurve für die Gruppe I (Eisencarbonattiere) erheblich steiler und tiefer abfällt als die Kurve der Kontrolltiere, Gruppe III. Dagegen fällt die Kurve der Eisenoxydtiere der Gruppe II etwas weniger steil und auch nicht ganz so tief ab, wie die Kurve der Kontrolltiere der Gruppe III.

Wir wenden uns den Eisensulfattieren zu. Der Gewichtssturz verlief bei beiden Gruppen (IV und V) ungefähr gleichmäßig, etwas weniger steil fielen die Kurven ab, als die Kurve der Gruppe III (Kontrolle). Im Vergleich zu der Kurve der Eisenoxydgruppe II verliefen die beiden Kurven der Eisensulfattiere (Gruppe IV und V) in den ersten 4 Wochen etwas steiler, in den letzten 2 Wochen aber etwas weniger steil. Besonders in den ersten Tagen des Versuchs war die Verzögerung des Gewichtssturzes bei den Tieren mit bestrahltem Sulfat größer als bei den Tieren mit unbestrahltem Sulfat.

Aus alledem ergibt sich, daß die Gabe von aktivem Eisenoxyd, wie von bestrahltem und unbestrahltem Eisensulfat den Gewichtssturz bei Reistauben etwas verlangsamt hat.

Weiter ist noch folgendes zu bemerken. Alle Tauben zeigten in einem gewissen Stadium der Krankheit Krämpfe, mit Ausnahme der

Eisenoxydtiere. Schwäche in den Beinen zeigten in der vierten Woche von Gruppe I: 75 %, Gruppe II: 38 %, Gruppe III: 38 %, Gruppe IV: 25 %, Gruppe V: 25 %. Die ersten Tiere starben von der Gruppe I in der dritten Woche, der Gruppe II in der vierten Woche, der Gruppe III in der dritten Woche, der Gruppe IV in der vierten Woche, der Gruppe V in der dritten Woche. Es waren tot am Ende der vierten Woche von Gruppe I: 75 %, Gruppe II: 62 %, Gruppe III: 62 %, Gruppe IV: 38 %, Gruppe V: 50 %.

Man sieht: Das Eisencarbonat hatte beschleunigend auf den Todeseintritt gewirkt, das Eisenoxyd hatte die Zeit bis zum Todeseintritt unbeeinflusst gelassen, das unbestrahlte Eisensulfat hatte diese Zeit ein wenig, das bestrahlte Eisensulfat aber hatte sie bedeutend verlängert, alles natürlich im Vergleich zu den Kontrolltieren der Gruppe III.

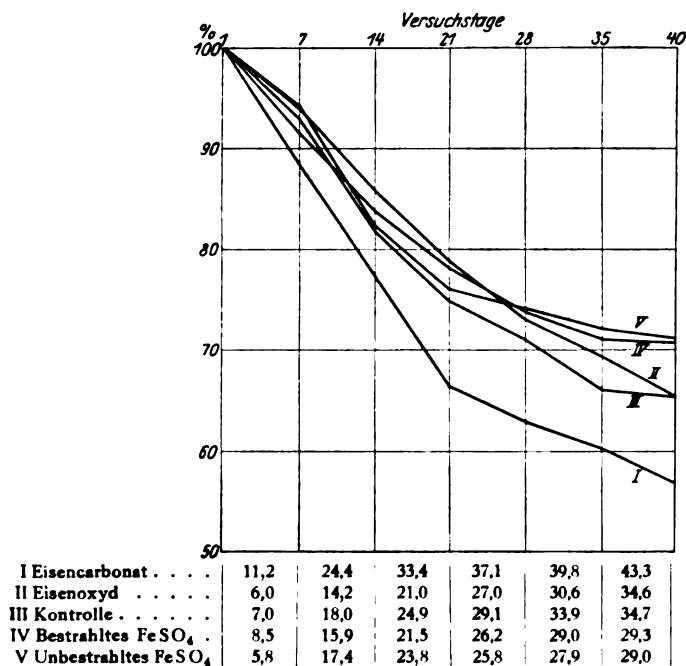


Abb. 1.

Durchschnittlicher prozentiger Gewichtssturz bei jeder Gruppe.

Ergebnisse.

1. Bei Reistauben verzögert die tägliche Gabe von 5 mg aktiven *Baudischschen* Eisenoxyds zwar den Todeseintritt nicht, wohl aber hält sie den Gewichtssturz etwas auf.

2. Bei Reistauben verzögert die tägliche Gabe von 50 mg unbestrahlten oder mit Ultraviolettlicht bestrahlten Eisensulfats den Gewichtssturz, besonders aber die Gabe des bestrahlten Eisensulfats auch den Todeseintritt.

3. Das benzidinaktive Eisencarbonat wirkte in jeder Beziehung ungünstig auf den Verlauf der Avitaminose bei Reistauben.

Experimentelle Teil.

Gruppe I.

10 mg aktiven Eisencarbonats täglich pro Tier.

Versuchstage:	1	7	14	21	28	35	42
Taube Nr. 1 . . .	310	295	250	225	205	185	180
" " 2 . . .	440	370	290	240			
" " 3 . . .	460	405	315	255	225		
" " 5 . . .	400	342	305	280	280	255	235
" " 6 . . .	400	350	325	295	270	225	
" " 7 . . .	412	410	350	320	295	270	232
" " 8 . . .	380	305	280	245	228	210	205
" " 9 . . .	400	370	305	270	235		
Durchschnittsgew. .	400,25	355,87	302,5	266,25			
Gewichtssturz % .		— 11,2	— 24,4	— 33,4			
Durchschnittsgew. f. die lebenden 7 .	394,57				248,28		
Gewichtssturz % .					— 37,07		
Durchschnittsgew. f. die lebenden 5 .	380,4					229	
Gewichtssturz % .						— 39,8	
Durchschnittsgew. f. die lebenden 4 .	375,5						213
Gewichtssturz % .							— 43,27

Gruppe II.

5 mg aktiven Eisenoxys täglich pro Tier.

Versuchstage:	1	7	14	21	28	35	42
Taube Nr. 11 . . .	335	355	320	300	295	280	270
" " 12 . . .	368	360	315	310	285	270	260
" " 13 . . .	308	310	265	250	240	225	230
" " 14 . . .	368	310	300	260	230		
" " 15 . . .	500	440	400	355	335	290	295
" " 17 . . .	382	365	335	330	310	290	235
" " 18 . . .	330	320	295	250	223		
" " 19 . . .	400	350	335	299	265	237	210
Durchschnittsgew. .	373,87	351,25	320,62	294,25	272,85		
Gewichtssturz % .		— 6	— 14,2	— 21	— 27,02		
Durchschnittsgew. f. die lebenden 6 .	382,16					265,33	250
Gewichtssturz % .						— 30,57	— 34,58

Gruppe III.

Pillenmasse ohne Eisen.

Versuchstage:	1	7	14	21	28	35	42
Taube Nr. 20 . . .	470	425	365	345	310	300	280
" " 21 . . .	468	460	380	340	305	255	
" " 22 . . .	500	460	405	390			
" " 23 . . .	340	330	300	268	260	230	230
" " 24 . . .	360	350	310	285	275	270	260
" " 25 . . .	475	400	360	315			
" " 26 . . .	380	355	330	315	295	285	270
" " 28 . . .	472	440	385	345	320	310	280
Durchschnittsgew. .	433,12	402,5	354,37	325,37			
Gewichtssturz % .		— 7	— 18	— 24,87			
Durchschnittsgew. f. die lebenden 6 .	415				294,16	274,5	
Gewichtssturz % .					— 29,12	— 33,85	
Durchschnittsgew. f. die lebenden 5 .	404,4						264
Gewichtssturz % .							— 34,71

Gruppe IV.

50 mg Eisensulfat (bestrahltes) täglich pro Tier.

Versuchstage:	1	7	14	21	28	35	42
Taube Nr. 30 . . .	340	325	310	285	280	268	270
" " 31 . . .	355	325	300	285	270	260	260
" " 32 . . .	360	330	280	260	235	220	213
" " 33 . . .	340	310	270	245	220		
" " 34 . . .	345	315	320	310	300	300	305
" " 35 . . .	435	410	375	325	305	270	260
" " 36 . . .	435	405	375	360	335	310	315
" " 39 . . .	390	325	295	285	270	260	255
Durchschnittsgew. .	375	343,12	315,62	294,37	276,88		
Gewichtssturz % .		— 8,5	— 15,86	— 21,5	— 26,16		
Durchschnittsgew. f. die lebenden 7 .	380					269,7	268,3
Gewichtssturz % .						— 29,02	— 29,32

Gruppe V.

50 mg Eisensulfat (nicht bestrahltes) täglich pro Tier.

Versuchstage:	1	7	14	21	28	35	42
Taube Nr. 40 . . .	350	315	285	270	260	263	255
" " 42 . . .	325	300	260	253	248		
" " 43 . . .	345	315	285	258	250	255	255
" " 44 . . .	440 *	405	335	305			
" " 45 . . .	500	470	400	390	375	337	335
" " 46 . . .	355	330	300	290	273	285	280
" " 47 . . .	310	305	260	230	210	200	195
" " 48 . . .	560	560	505	435	420		
Durchschnittsgew. .	398,12	375	328,75	303,87			
Gewichtssturz % .		— 5,81	— 17,42	— 23,68			
Durchschnittsgew. f. die lebenden 7 .	392,14				290,86		
Gewichtssturz % .					— 25,82		
Durchschnittsgew. f. die lebenden 5 .	372					268	264
Gewichtssturz % .						— 27,95	— 29,03

Literatur.

1) *Banerjee*, diese Zeitschr. 180, H. 1/3, S. 27, 1927. — 2) *Baudisch und Welo*, Die Naturwissenschaften, 13. Jahrg., H. 36.

Zur Blutzuckerfrage.

III. Mitteilung:

Weiteres über die Nichtglucose der Blutfiltrate.

Von

B. Sjollema.

(Aus dem Laboratorium für medizinische Veterinärchemie
der Reichsuniversität Utrecht.)

(Eingegangen am 15. Juli 1927.)

In meiner zweiten Mitteilung¹ konnte festgestellt werden, daß die Stoffe der Nichtglucosefraktion des Blutfiltrats — also die Stoffe des eiweißfreien Blutfiltrats, welche Rotblutlaugensalz reduzieren und von Kohle aus einer Lösung, die $\frac{1}{2}$ % Essigsäure enthält, adsorbiert werden — hauptsächlich in den Blutkörperchen vorkommen, und daß die Größe dieser Fraktion nicht oder nur wenig von verschiedenen Stoffwechselstörungen beeinflusst wird. Es war deshalb wahrscheinlich, daß diese Fraktion der Hauptmenge nach nicht aus Kohlehydraten besteht². Im Blute vorhandene Hexosephosphorsäureester müssen, wie gefunden wurde, sich in der Nichtglucosefraktion befinden. Es mußte nun weiter das Verhalten der anderen in den Blutfiltraten vorkommenden reduzierenden Körper, z. B. die Schwefelverbindungen, untersucht werden.

Bevor die betreffenden Untersuchungen mitgeteilt werden, schicke ich einige Bemerkungen über die zu verwendende Kohle voran und erwähne ich neue Untersuchungen über den Nachweis von Milchzucker in Blutfiltraten.

In meiner zweiten Mitteilung wurde erwähnt, daß nicht für alle Kohlesorten eine $\frac{1}{2}$ %ige Essigsäurelösung genügend stark ist, um Bindung von Glucose vorzubeugen.

¹ Diese Zeitschr. 185, 355, 1927.

² Ausgenommen da, wo das Blut viel Milchzucker enthält.

Diesbezüglich wurde folgendes gefunden:

Wenn die für die früheren und für die vorliegenden Untersuchungen benutzte *Mercksche Kohle* [*Carbo medicinalis* (neu)] dadurch gereinigt wurde, daß mit Äther plus Wasser geschüttelt (auf 25 g Kohle 150 ccm Äther und 500 ccm Wasser) wurde, nach 24 Stunden abgesaugt, dann mit 1 Liter zweimal destilliertem Wasser gewaschen, im Vakuum-exsikkator über Schwefelsäure getrocknet und nachher in einem elektrischen Ofen bis auf 300° C getrocknet und noch 1 Stunde in einem Glasrohr auf 400° C erhitzt, so bindet diese Kohle Glucose aus einer ½ %igen Essigsäurelösung. Es wurde dabei natürlich genau nach der immer benutzten Weise gearbeitet, und zwar so, daß 100 ccm einer 0,1°/00igen Glucoselösung, die ½ % Essigsäure enthält, eine ½ Stunde mit 5 g Kohle geschüttelt, abgesaugt und mit ½ %iger Essigsäure bis auf 200 ccm nachgewaschen wurde. Wird ¾ %ige Essigsäurelösung genommen, so bleibt die Glucose vollständig in Lösung. Der Versuch wurde wiederholt und dabei ein Teil der mit Äther gereinigten Kohle auf 400° C und der andere Teil auf 200° C erhitzt.

Mit beiden Portionen wurden wieder dieselben Resultate erhalten; auch jetzt wurde etwa ¼ Teil der Glucose gebunden, wenn die Flüssigkeit nur ½ % Essigsäure enthielt; jedoch blieb die Glucose vollständig frei, falls Essigsäure von ¾ % verwendet wurde. Man muß also das Bindungsvermögen der Kohle für Essigsäurelösungen untersuchen, bevor man sie für Glucosebestimmung von Blutfiltraten benutzt. Auch muß mehr Äther hinzugesetzt werden, wo Kohle verwendet wird, welche aus ½ %iger Essigsäurelösung Glucose bindet.

Statt 15 ccm mußte beim Gebrauch von der Kohle, die mit Äther gereinigt und nachher auf 200 bzw. 400° C erhitzt war, 20 ccm verwendet werden.

Wie in den beiden früheren Mitteilungen schon betont wurde, ist bei Anwesenheit von Milchzucker im Blute die zweite Fraktion erhöht.

Es wurde dies nochmals mit Rinderblut bewiesen. Blut und Harn der Milchkuh¹ wurden vor und nach der Insufflation von Luft im Euter untersucht. Die Resultate waren beim Blute folgende:

Vor der Insufflation waren die Fraktionen	68,5	13	6,5 %
1 Stunde nach der Insufflation	65,9	30,8	7,6 %
2 Stunden später (also 3 Stunden nach der Insufflation)	69	36,2	4,4 %

Die erste Fraktion (Glucose) blieb also ungeändert; die zweite (Nichtglucose) wurde größer, sie stieg von 13 auf 36,2. Der Unterschied

¹ Die Kuh gab nur wenig Milch (etwa 7 Liter pro Tag). Dies erklärt der ziemlich niedrige Zuckergehalt des Harns nach der Insufflation; so auch, daß die Blutzuckersteigerung nicht groß war.

muß wohl gänzlich auf Rechnung des Milchzuckers geschrieben werden. Die Harnmengen, welche gleichzeitig mit den Blutproben nach der Insufflation katheterisiert wurden, enthielten bzw. etwa 0,7 und 1,4 % nichtgärenden Zucker (berechnet als Milchzucker).

Weil man noch nicht weiß, ob die zweite Fraktion des Vollblutfiltrats eine ziemlich konstante Größe ist, kann man im Vollblut kleine Mengen Milchzucker nicht mit Sicherheit nachweisen. Nachdem gefunden worden war, daß die zweite Fraktion beim normalen Blute sich hauptsächlich in den Blutkörperchen vorfindet und es schon von vornherein anzunehmen war, daß der Milchzucker im Plasma aufgelöst sein würde, habe ich vom Blute (mit NaF) einer Milchkuh (die täglich etwa 8 Liter Milch gab) sowohl die Körperchen wie das Plasma vor und nach Luftinsufflation auf die drei (zwei) Fraktionen untersucht. Der Harn enthielt 2 Stunden nach der Insufflation (gleichzeitig mit dem Blute entnommen) etwa 1 % Milchzucker.

Vor der Insufflation waren die drei Fraktionen in den Blutkörperchen 22,7, 89,1 und 8,2; total 120; nach der Behandlung 34,7, 75,7 und 1,8; total 112,2. Die Totalreduktion war also niedriger geworden, so auch die Summe der zweiten und dritten Fraktion, sie fiel von 97,3 auf 77,5 zurück. Es enthielten Blutkörperchen nach der Insufflation also keine Lactose. Das Plasma hatte hingegen nach der Insufflation einen höheren Gehalt an Nichtglucose, und auch die Totalreduktion war erhöht, denn die Werte der drei Fraktionen betrugen vor der Insufflation 67,6, 6,4 und 8; Totalreduktion 82; 2 Stunden nach der Behandlung 58,8, 35,6 und 0; total 94,4. Besonders war die zweite Fraktion größer geworden, sie stieg von 6,4 auf 35,6. Auch die Totalreduktion war im Plasma gestiegen (von 82 bis 94,4). Man darf also behaupten, daß Milchzucker im Blute durch die hier mitgeteilte Methode im Plasma gefunden werden kann. Das Plasma zeigt eine anormal große zweite Fraktion.

Ob es pathologische Zustände gibt, bei denen andere Stoffe als Lactose eine hohe zweite Fraktion im Plasma verursachen, kann jetzt nicht gesagt werden.

Findet man einen normalen Wert für die Nichtglucosefraktion der Körperchen, jedoch einen zu hohen Wert für die des Plasmas, so darf man die Anwesenheit von Lactose für sehr wahrscheinlich halten.

In meiner zweiten Mitteilung wurde schon mitgeteilt, wie sich die Hexosephosphorsäureester bei dem Fraktionieren der reduzierenden Blutbestandteile verhalten. Dasselbe mußte noch von anderen

reduzierenden Bestandteilen des Blutes, wie Ergothionein¹, Glutathion² und Diphosphoglycerinsäure³ untersucht werden⁴. Es wurden vom Ergothionein und vom Glutathion 0,1- und 0,03⁰/₁₀₀ige Lösungen dargestellt und das Reduktionsvermögen für Rotblutlaugensalz in der früher beschriebenen Weise festgestellt.

Die Lösungen wurden auch mit Kohle [*Mercks* Carbo medic. (neu)] plus Essigsäure (1/2 %ig) und Kohle plus Äther, wie früher für andere Lösungen angegeben wurde, geschüttelt und die Filtrate mit Blutlaugensalz untersucht; es wurde also auch die Bindung an Kohle bei Anwesenheit von Essigsäure oder von Äther bestimmt.

Das Reduktionsvermögen der 0,1⁰/₁₀₀igen Lösung des Ergothioneins wurde fünfmal bestimmt; gefunden wurde 79,3, 86,3, 86,3, 84,2 und 84,2; im Mittel 84 (Glucose = 100). Das der 0,03⁰/₁₀₀igen Lösung wurde viermal bestimmt; gefunden wurde im Mittel 83. Es darf also auf etwa 84 — das der Glucose auf 100 setzend — angenommen werden.

Von Kohle und Essigsäure (auf 100 ccm 5 g Kohle und 1/2 ccm Eisessig) wird es aus beiden Lösungen beinahe vollständig gebunden. Aus der 0,1⁰/₁₀₀igen Lösung blieben nur 7 % des Ergothioneins in Lösung, aus der 0,03⁰/₁₀₀igen nur 5 %. Das Ergothionein wird also in der Glucosefraktion so gut wie nicht vorkommen; dies um so mehr nicht, weil die Blutfiltrate wohl weniger als 0,03⁰/₁₀₀iges Ergothionein enthalten. Mit Kohle und Äther bleibt der größte Teil des Ergothioneins in Lösung, und zwar 64 % der 0,1⁰/₁₀₀igen Lösung und 70 % der 0,03⁰/₁₀₀igen Lösung. Die Hauptmenge befindet sich also in der zweiten Fraktion.

Weiter wurde das Verhalten des Ergothioneins KMnO_4 -Lösungen gegenüber untersucht. Die Lösungen (0,1- und 0,03⁰/₁₀₀ig) wurden bei Zimmertemperatur mit n/100 KMnO_4 versetzt und durch Zusatz von wenig H_2SO_4 so gut wie neutral gehalten. Das KMnO_4 wird anfangs schnell, nachher langsam reduziert. Die Behandlung dauerte etwa

¹ Dieser Körper wird auch Sympectothion und Thiasin genannt; er ist Thiohistidinbetain. Journ. Biol. Chem. **65**, 623, 1925; **67**, 267, 1926; **72**, 123 und 367, 1927; Journ. Amer. Chem. Soc. **49**, 575, 1927; Journ. de Pharm. et de Chim. **80**, 145, 1909; Bull. Soc. Chim. **81**, 444, 1923; Journ. Chem. Soc. **99**, 2336, 1911.

² Biochemical Journ. **15**, 286, 1921; **17**, 586, 1923; **19**. Ob Glutathion wirklich im Blute vorkommt, ist, soweit ich weiß, noch nicht bewiesen.

³ Zeitschr. f. physiol. Chem. **165**, 171, 1927.

⁴ Durch die große Liebenswürdigkeit des Herrn *B. A. Eagles* war ich in der Lage, das Ergothionein, und durch die des Herrn *F. Gowland Hopkins*, das Glutathion zu untersuchen. Beiden Herren sage ich hier nochmals herzlich Dank.

Die Diphosphoglycerinsäure hoffe ich bald untersuchen zu können. Ob sie Rotblutlaugensalz reduziert, ist aber wenig wahrscheinlich.

1½ Stunden. Nachdem das MnO_2 abfiltriert und das Filter ausgewaschen war, wurde in der gewöhnlichen Weise das Reduktionsvermögen mit Rotblutlaugensalz bestimmt. Von der 0,1⁰/₀₀igen Lösung betrug es noch 15 %, von der 0,03⁰/₀₀igen noch 5 % des ursprünglichen Wertes. Vielleicht sind die in der Lösung sich befindenden Manganverbindungen nicht ganz ohne Einfluß auf das Rotblutlaugensalz, und wird die oxydierte Ergothioneinlösung dadurch eine kleine Reduktion zeigen.

Man kann also mit $KMnO_4$ n/100 in Blutfiltraten das Ergothionein nahezu vollständig wegoxydieren.

Auf 10 ccm der 0,1⁰/₀₀igen Lösung wurden etwa 7 ccm n/100 $KMnO_4$ verbraucht. Ergothionein wurde von Vollerserde, von Kaolin und von Silicagel nicht adsorbiert.

Es muß weiter noch bemerkt werden, daß das Ergothionein bei der Blutzuckerbestimmung nach *Folin* und *Wu* nur eine schwach reduzierende Wirkung zeigt. Mit diesem Reagens verhält das Reduktionsvermögen sich zu dem der Glucose wie etwa 15 : 100¹. Das Ergothionein kann also bei der Blutzuckerbestimmung nach *Folin* und *Wu* nur einen kleinen Fehler verursachen; vielleicht von 3 oder 4 mg-%. Das Ergothionein muß in den Untersuchungen, welche zu der Annahme führten, daß im Blute eine besondere Glucoseform vorkommt, unzweifelhaft die Ursache von falschen Schlußfolgerungen gewesen sein. Erstens weil Reduktion und optische Aktivität sich ungleich für Ergothionein und Glucose verhalten [die Reduktion des Ergothioneins ist kleiner, sein Drehungsvermögen ($[\alpha]_D = 110^\circ$) größer als von Glucose], zweitens weil nach meinen Untersuchungen (II. Mitteilung) die Nichtglucosefraktion beim Diabetiker nicht erhöht ist. Das Verhältnis zwischen dem Gehalt an Glucose und an Nichtglucose ist also anders als beim normalen Individuum und deshalb auch der relative Einfluß der Nichtglucosefraktion.

Die Untersuchungen von *Winter* und *Smith* und von *Lundsgaard* und *Holboll* müssen also mit Blutfiltraten, welche mit Kohle und Essigsäure geschüttelt worden sind, wiederholt werden.

Das Reduktionsvermögen des Glutathions in der Disulfidform (Rotblutlaugensalz gegenüber) war in 0,1⁰/₀₀iger Lösung im Mittel 48,5, also ungefähr die Hälfte von dem der Glucose (fünf Analysen lieferten folgende

¹ Von den drei Hexosephosphorsäureestern (*Neuberg*, *Robison* und *Diphosphat*) ist aber das Reduktionsvermögen dem Reagens von *Folin* und *Wu* gegenüber ziemlich groß. Das molekulare Reduktionsvermögen der beiden Monophosphate verhält sich zu dem der Glucose wie etwa 70 : 100; dasselbe vom Diphosphat wie etwa 60 : 100.

Werte: 44,4, 49,6, 46,7, 50,9, 50,6). Mit einer 0,03%igen Lösung wurde ungefähr derselbe Wert gefunden¹.

Wenn das Glutathion mit Zinkstaub und Schwefelsäure zu der Thiolform reduziert wurde², stieg das Reduktionsvermögen nicht merkbar. Behandlung der Glutathionlösungen, sowohl in Disulfid- wie in Thiolform, mit Kohle plus Essigsäure zeigte, daß dieser Körper dabei so gut wie vollständig adsorbiert wird; mit Kohle und Äther blieben beide hingegen so gut wie vollständig in Lösung. Das Glutathion muß sich also in der zweiten Fraktion befinden; gleichwie Ergothionein wird es also durch Schütteln mit Kohle und Essigsäure von Glucose getrennt. Die oxydierte Form (Disulfid) reduzierte verdünnte KMnO_4 -Lösungen (n/100) bei Zimmertemperatur nicht, oder nur in unbedeutenden Mengen. Die Thiolform hingegen reduziert deutlich. Auf 5 ccm der 0,1%igen Lösung wurden 2 ccm n/100 KMnO_4 -Lösung bei Zimmertemperatur in etwa 1½ Stunden entfärbt³.

Wie zu erklären ist, daß beide Formen dasselbe Reduktionsvermögen Rotblutlaugensalz gegenüber haben, sich jedoch so sehr mit KMnO_4 -Lösungen unterscheiden, wurde bis jetzt nicht untersucht. Ebenso wenig wurde die Frage verfolgt, wie man interpretieren muß, daß die Thiolform nach Oxydation mit KMnO_4 nur noch ein schwaches Reduktionsvermögen (Rotblutlaugensalz gegenüber) besitzt⁴ — etwa 25 % des ursprünglichen —, während die Disulfidform kein KMnO_4 reduziert und dennoch sich von der Thiolform Rotblutlaugensalz gegenüber nicht unterscheidet.

Die reduzierte Form wurde von Vollserde nicht gebunden; sie zeigt nur ein schwaches Reduktionsvermögen für das *Folin* und *Wu*-Reagens; ungefähr $\frac{1}{8}$ Teil von dem der Glucose.

Aus den mitgeteilten Analysen erfolgt, daß, wenn die Blutfiltrate mit Kohle und Essigsäure geschüttelt werden, das Ergothionein und das Glutathion bei der Blutzuckerbestimmung mit Rotblutlaugensalz keinen nennenswerten Fehler verursachen.

¹ Weil das Präparat nicht absolut rein war, wird der angegebene Wert vielleicht nicht ganz richtig sein.

² 50 mg Glutathion wurden in 2½ ccm Wasser gelöst, 200 mg Zinkstaub und 2½ ccm n H_2SO_4 hinzugesetzt, 1 Stunde auf 50° im Wasserbad erhitzt und mit ausgekochtem Wasser auf 500 ccm gebracht (der ungelöste Zinkstaub wurde entfernt). Diese Lösung gibt im Gegensatz zu der Disulfidform nach Zusatz von einem Überschuß von Ammonsulfat und Ammoniak eine deutliche Rotfärbung mit einer Nitroprussidnatriumlösung.

³ Ein Blindversuch mit Zinkstaub und Schwefelsäure zeigte, daß die Reduktion wirklich dem Glutathion zugeschrieben werden muß.

⁴ Es kann sein, daß diese schwache Reduktion von den gelösten Mn-Verbindungen herrührt.

Für ein weiteres Fraktionieren der reduzierenden Blutbestandteile und für die Bestimmung dieser Stoffe nebeneinander ist es erwünscht, daß ein Adsorbens zur Verfügung steht, das kein S und P abgibt, sowie ein Mittel zur Darstellung von eiweißfreien Blutfiltraten, das diese Elemente nicht enthält¹.

Weiter kann zur Trennung und zur Bestimmung der reduzierenden Stoffe nebeneinander daran gedacht werden, verschiedene Oxydationsmittel zu verwenden² und bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen der Lösungen zu oxydieren.

Als brauchbares Adsorbens hoffe ich aktive Kohle aus Zucker darzustellen und auch noch andere Mittel zu versuchen. Zur Darstellung von eiweißfreien Blutfiltraten wurde anstatt wolframsauren Natriums und Schwefelsäure einige Male schwefelfreie Trichloressigsäure benutzt, besonders da, wo Schwefelbestimmungen zu machen waren.

Die Frage, ob die reduzierenden Blutbestandteile sich dadurch voneinander unterscheiden, daß die H-Ionenkonzentrationen die Oxydation verschieden beeinflussen, wurde mit Glucose und mit der Nichtglucosefraktion von Blutfiltraten untersucht.

Glucose reduzierte Blutlaugensalz nur sehr wenig, wenn das p_H kleiner war als etwa 9,5³. Dasselbe war für die Nichtglucose⁴ der Fall. Es scheint also vorläufig wenig hoffnungsvoll, durch Beeinflussung des p_H die reduzierenden Blutbestandteile nebeneinander zu bestimmen, wenigstens Rotblutlaugensalz⁵ kommt dafür nicht in Betracht.

Bei der Anwendung von Trichloressigsäure zur Herstellung von eiweißfreien Filtraten mußte natürlich die freie Säure im Filtrat neu-

¹ Es konnte S in Blutfiltraten, und zwar in organischer Form, nachgewiesen werden.

² Es wurden nur Versuche mit n/100 KMnO₄ gemacht. Lösungen von Wolframsäure und von Trichloressigsäure wirken aber nach der Behandlung mit KMnO₄ reduzierend auf Rotblutlaugensalz ein, besonders stark nach dem Schütteln mit Kohle. Es werden jetzt andere Oxydationsmittel, z. B. H₂O₂ und J in schwach alkalischer Lösung versucht.

³ Für Fructose und für Dioxyceton ist die Reduktion zwischen p_H 8 und 9 schon von einiger Bedeutung, etwa 14%; für Glucose nur etwa 8% der Maximalen. Es wurde der Versuch so eingerichtet, daß die p_H die gewünschte Größe zeigte, nachdem der Sodazusatz stattgefunden hatte; also in dem Moment als Blutlaugensalz hinzugesetzt wurde.

⁴ Als Nichtglucose wurde benutzt die Lösung, welche durch Schütteln mit Äther plus Wasser erhalten wurde aus Kohle, die vorher mit einem Blutfiltrat und Essigsäure geschüttelt worden war. Weil diese Extraktion der Nichtglucose unvollständig ist, enthielt sie vielleicht nicht alle Bestandteile der Nichtglucosefraktion.

⁵ Es wurde auch untersucht, ob Trichloressigsäure das Reduktionsvermögen von Glucose, Rotblutlaugensalz gegenüber, beeinflußt. Dies war nicht der Fall.

traliert werden. Auf 5 Volumen Vollblut wurden 4 Volumen einer 20 %igen Lösung, auf 5 Volumen Plasma 3 Volumen und auf 5 Volumen Blutkörperchen 8 Volumen verwendet und mit Wasser immer auf 20 Volumen gebracht.

Es wurde mit Rinderblut (NaF) — Plasma und Blutkörperchen — näher festgestellt, daß die Zahlen der Wolframsäurefiltrate mit denen der Trichloressigsäure nicht übereinstimmen. Die Glucosefraktionen (das Kohle- + Essigsäurefiltrat) aber zeigten keine nennenswerten Unterschiede.

Der Wert dieser Fraktion wurde im Trichloressigsäurefiltrat vom Plasma einer Pferdeblutprobe zu 66,8, im Wolframsäurefiltrat zu 68,3 mg-% gefunden; in den Filtraten der Blutkörperchen bzw. 30,5 und 34,2. Die Filtrate selbst, und deshalb auch die Summe der zweiten und dritten Fraktionen, zeigten aber deutliche Unterschiede.

Für das Plasma waren die Zahlen der Totalreduktion mit Trichloressigsäure und Wolframsäure 78,2 und 91; die Summe der zweiten und dritten Fraktion 11,4 und 22,7; für die Blutkörperchen waren die Zahlen der Totalreduktion 98,4 und 117,9, und für die Nichtglucosefraktion 67,9 und 83,9. Von den anderen Analysen, welche dazu dienten, zu untersuchen, ob beide Enteiweißungsmittel gleich brauchbar sind, erwähne ich hier, daß für Pferdeblut (Vollblut) eine Totalreduktion im Trichloressigsäurefiltrat von 105,9 und im Wolframsäurefiltrat von 127,5 mg-% gefunden wurde; auch hier also ein deutlicher Unterschied. Anderes Pferdeblut ergab mit Trichloressigsäure als Glucosefraktion 80,7 und als Nichtglucosefraktion 24,1; mit Wolframsäure 82,5 und 29,7 mg-%.

Es scheint die Annahme gerechtfertigt, daß die Trichloressigsäure aus dem Blute, und zwar sowohl aus den Körperchen als aus dem Plasma, reduzierende Stoffe niederschlägt, welche mit Wolframsäure in Lösung bleiben. Die Glucose bleibt in beiden Filtraten vollständig in Lösung.

Weil eine 0,1%ige Ergothioneinlösung mit Trichloressigsäure keinen Niederschlag gibt, darf wohl angenommen werden, daß die Trichloressigsäure den Gehalt an Ergothionein in den Blutfiltraten nicht beeinflußt.

Es wurden zweimal Blutproben untersucht mit dem Zwecke, den Gehalt an neutralem Schwefel kennenzulernen. Dazu wurden eiweißfreie Filtrate mittels Trichloressigsäure gemacht. Wie schon oben erwähnt wurde, wird dabei ein Teil der reduzierenden Stoffe entfernt.

Die Schwefelbestimmungen wurden nach *Denis* und *Reed*¹ vorgenommen. In das Filtrat (Trichloressigsäure) von Pferdeblutkörperchen wurde als Summe der zweiten und dritten Fraktion gefunden 61,2, also umgerechnet auf Ergothionein $61,2 \frac{100}{84} = 72,8^*$, während der Gehalt an organischem (neutralem) Schwefel 3,88 mg auf 100 ccm Körperchen betrug; umgerechnet auf Ergothionein 27,7 mg. Nach diesem Ergebnis müssen die Körperchen also noch andere reduzierende Verbindungen (Nichtglucose) als Ergothionein, bzw. Ergothionein und Glutathion, enthalten.

Das Plasmafiltrat dieses Blutes hatte eine zweite plus dritte Fraktion von 18,7, also umgerechnet auf Ergothionein von 22,3 mg.

Das Plasmafiltrat enthielt 3,41 mg neutralen Schwefels (auf 100 ccm Plasma) = 24,4 mg Ergothionein. Obwohl diese Zahlen gut übereinstimmen, darf daraus nicht geschlossen werden, daß wirklich im Plasma Ergothionein vorkommt, denn die Plasmafiltrate reduzieren n/100 KMnO_4 nur langsam, während Ergothionein es sehr schnell tut.

Von dem Filtrat (Trichloressigsäure) von Rinderblutkörperchen war die Summe der zweiten und dritten Fraktion 55,4; umgerechnet auf Ergothionein also 66 mg auf 100 ccm Körperchen, während der neutrale Schwefel 7,2 mg oder, auf Ergothionein umgerechnet, 51,4 mg war. Auch hier kam also wahrscheinlich andere Nichtglucose vor.

Im Plasma dieses Blutes scheinen andere, nicht reduzierende Schwefelverbindungen (neutraler Schwefel) vorzukommen, denn die zweite und dritte Fraktion ist viel kleiner (13) als mit dem neutralen Schwefelgehalt von 7,9 mg übereinstimmen würde, falls der Schwefel nur als Ergothionein anwesend war.

Es kann auf Grund der hier und früher von mir mitgeteilten Untersuchungen empfohlen werden, in folgender Weise den Glucosegehalt von Blutfiltraten zu bestimmen:

Auf 4 ccm des gewöhnlichen, nach *Folin* und *Wu* hergestellten Filtrats (also mit wolframsaurem Natrium und Schwefelsäure von

¹ Journ. Biol. Chem. 71, 191, 1926/27. Bei dieser Methode wird nach Veraschung mittels $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_4\text{Cl}$ und NaCl unter Zusatz von Gelatine das gebildete BaSO_4 nephelometrisch bestimmt. Die BaCl_2 -Lösung muß dabei immer in derselben Weise mit der Flüssigkeit gemischt werden, und besonders da, wo NaF -Blut verwendet wird, muß dafür gesorgt werden, daß das p_{H} zwischen 3 und 3,8 liegt.

Wo der neutrale Schwefel bestimmt wird, muß natürlich auch die Summe der anorganischen Sulfate und der Ätherschwefelsäure bekannt sein. Auch für diese Schwefelformen geben *Denis* und *Reed* eine Methode an.

* *Newton*, *Benedict* und *Dakin* (Journ. Biol. Chem. 72, 367, 1927) konnten aus 1 Liter Schweineblut (Vollblut) 145 mg Ergothionein isolieren und schätzen für Menschenblut den Gehalt auf 10 bis 25 mg pro 100 ccm.

1 Volumen auf 10 Volumen gebracht) wird 0,21 ccm Essigsäure von 10 % und dann 210 mg Kohle [Carbo medicinalis *Merck* (neu)] hinzugesetzt und nach einer halben Stunde abgesaugt¹. Es kann hierfür ein verengtes Rohr (Allihn), das ein wenig ausgewaschenen Asbest enthält, benutzt werden. Dann wird die Kohle mit so viel einer $\frac{1}{2}$ %igen Essigsäure nachgewaschen, daß das Volumen der Flüssigkeit 8 ccm beträgt. Diese 8 ccm werden neutralisiert², auf 10 ccm gebracht, in gewöhnlicher Weise mit Rotblutlaugensalz oxydiert und nach Zusatz von KJ, ZnSO_4 und Essigsäure mit Thiosulfat titriert.

Auch die oben mitgeteilten Analysen wurden von den Herren A. *Emmerie*, Assistent, und H. *Hooghoudt*, Analytiker, ausgeführt, und spreche ich hier meinen Dank für ihre Mitwirkung aus.

¹ Aus dem oben Mitgeteilten folgt, daß es erwünscht ist, zu untersuchen, ob die zu benutzende Kohle in der angegebenen Weise keine Glucose bindet. Die Möglichkeit ist ja nicht ausgeschlossen, daß das *Mercksche* Präparat in dieser Hinsicht nicht immer dasselbe ist.

² Es werden hierfür ungefähr 0,5 ccm n NaOH benötigt. Ein Indikator darf nicht hinzugesetzt werden. Um die zur Neutralisation erforderliche Anzahl Kubikzentimeter n NaOH genau kennenzulernen, muß ein größeres Volumen Blutfiltrat hergestellt werden und ein Teil davon nach der Behandlung mit Kohle und Essigsäure nur für die Bestimmung der zur Neutralisation erforderlichen NaOH benutzt werden.

Über Netzfermente.

Von

J. M. Goldberg.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Leningrader Instituts für Experimentalmedizin.)

(Eingegangen am 16. Juli 1927.)

Die physiologische Bedeutung des großen Netzes beschäftigt die Forschung schon seit längerer Zeit (für die ältere Literatur verweisen wir auf *Heusner*). Wie so häufig, knüpften sich auch hier die ersten Vorstellungen über die Funktion des Organs an die Kenntnismahme der morphologischen Details. Das im Netz außerordentlich entwickelte Gefäßnetz hatte schon relativ frühzeitig Veranlassung gegeben, dieses Organ als Regulator der Blutzirkulation anzusprechen. Die unmittelbare Beobachtung (*Schiefferdecker*) hatte diese Auffassung durchaus bestätigt, indem der Nachweis erfolgt war, daß das Netz bis zu einem Viertel des Blutgehalts der Bauchorgane aufzunehmen vermag (*Effet*). Das reich entwickelte Netzfett weist auf die Bedeutung des Netzes als Nährstoffdepot hin, und seine anatomische Lagerung gibt Veranlassung anzunehmen, daß das Netz eine Schutzvorrichtung ist für die Bauchorgane gegen mechanische Schädigung und Temperaturschwankungen. Jedoch damit sind noch lange nicht alle Funktionen dieses Organs erschöpft.

Schon im Beginn der bakteriologischen Ära war der Forschung eine spezielle Funktion des Netzes aufgefallen, und zwar seine Befähigung, in die Bauchhöhle eingedrungene Fremdkörper zu erfassen.

Diese Netzfunktion ist von *Jos. Koch* besonders eingehend studiert worden. Derselbe führte in die Bauchhöhle der Versuchstiere (Maus, Ratte, Hund, Affe) chinesische Tusche und verschiedene Bakterien (Staphylo- und Streptokokken, Diphtherie- und Tuberkelbazillen) ein und konnte in allen Fällen beobachten, daß die eingeführten Kolloidpartikel mit einer bemerkenswerten Auswahl in den Geweben abgelagert wurden. Sowohl Tusche, wie auch Bakterien wurden in erster Linie im Netz und erst nachher im Centrum tendineum des Diaphragmas abgelagert. *Koch* nimmt auf Grund seiner Versuche für dieses auswählende Verhalten folgende Erklärung in Anspruch: Direkte Folge der Einführung von Tuscheteilchen

und Bakterien in die Bauchhöhle ist eine entzündliche Reaktion. Die aus den Netzgefäßen ausgetretenen Leucocyten phagozytieren die erwähnten Partikel und werden darauf von neuem in die Lymphgefäße des Netzes aufgenommen. Hier werden sie in kleinen lymphoiden Anhäufungen zurückgehalten, an denen das Netz sehr reich ist. Zur Stütze seiner Auffassung beruft sich *Koch* auf den durch *Eelles*, *Weidenreich* u. a. nachgewiesenen Reichtum des Netzes an Lymphgefäßen, sowohl großen, den Blutgefäßen parallel hinziehenden, als auch feinen, oberflächlich gelegenen. In der Bahn dieser Lymphgefäße sind Lymphoidbildungen in Knötchenform zahlreich verstreut. Mit Recht nimmt *Weidenreich* auf Grund dieser Befunde an, daß das Netz einer gewissermaßen offenen Lymphdrüse gleichkomme und einer entsprechenden Funktion für die Bauchhöhle vorstehe.

Es scheint somit eine Aufgabe des Netzes zu sein, die Bauchhöhle von eingedrungenen Fremdkörpern zu säubern, und es reagiert ungemein empfindlich in dieser Richtung. Für die Säuberungsrolle des Netzes hat *Schmidt-Weiland* letzthin eine Bestätigung gegeben.

Im Zusammenhang mit solchen Funktionseigenheiten des Netzes schien es mir angebracht, dieses Organ auf seine Grundfermente zu prüfen. In der mir zugänglichen Literatur (speziell *Euler* und *Oppenheimer*) habe ich leider keine Anhaltspunkte finden können, und ich sah mich genötigt, eigene Versuche in der betreffenden Richtung anzustellen. In Angriff nahm ich die Proteasen, Lipasen und Amylasen des Netzes, und zwar fürs erste nur qualitativ.

Als Versuchsmaterial diente mir das große Netz des Hundes. Nach Eintritt des Verblutungstodes wurde das Netz, unter möglichster Vermeidung einer Verunreinigung, exstirpiert und sofort in Arbeit genommen. Der Prüfung auf Fermente ging p_H -Bestimmung voraus, immer auf elektrometrischem Wege mit Chinhydronelektroden.

I. Proteolytische Fermente.

Für die proteolytischen Fermente begann ich mit Selbstverdauungsversuchen. Feinzerteiltes, mit Sand zerriebenes Netz wurde in Ringerlösung gebracht, unter Toluolzusatz. Nach gründlicher Schüttelung dieser Mischung wurde eine Probe abfiltriert und der Rest im Brutschrank bei 38° abgestellt. Nach 24 Stunden, Entnahme einer zweiten Probe. Dauerte der Versuch 3 Tage, so wurde der Toluolzusatz erneuert. Zur Kontrolle wurde dasselbe an einer durchkochten Netzaufschwemmung wiederholt. Die Proben prüfte ich auf p_H , bestimmte den Gesamtstickstoff nach *Kjeldahl*, sowie den Reststickstoff, wobei die Eiweißfällung nach *Rona* und *Michaelis* mit Ferrum oxydat. dialysat. und $MgSO_4$ vorgenommen wurde und nach der Fällung der Filtratstickstoff gleichfalls nach *Kjeldahl* zur Bestimmung kam.

Nachstehend gebe ich eines der Protokolle dieser Versuchsreihe: In 600 ccm Ringerlösung wird 80,0 feinzerteiltes, mit Sand zerriebenes Netz gebracht. Die Aufschwemmung wird in zwei Portionen zu je

300 ccm geteilt und einer jeden 20 ccm Toluol zugesetzt. Die eine Portion wird 10 Minuten gekocht, die andere bleibt ungekocht. Für Veraschung bei der Stickstoffbestimmung werden je 25 ccm abgeteilt. Der Stickstoffgehalt fand seinen Ausdruck in der Größenmenge gebundener $n/10 \text{ H}_2\text{SO}_4$.

Probe gekocht		Probe ungekocht	
$p_H = 7,3$		$p_H = 7,3$	
Gesamtstickstoff	0,5 ccm	Gesamtstickstoff	0,2 ccm
Reststickstoff	0 "	Reststickstoff	0 "
Nach 24 Std. Brutschranktemperatureinwirkung:			
$p_H = 6,1$		$p_H = 7,0$	
Gesamtstickstoff	1,5 ccm	Gesamtstickstoff	0,7 ccm
Reststickstoff	0,5 "	Reststickstoff	0 "
Nach 3×24 Std. Brutschranktemperatureinwirkung:			
$p_H = 4,6$		$p_H = 6,4$	
Gesamtstickstoff	6,3 ccm	Gesamtstickstoff	1,5 ccm
Reststickstoff	3,6 "	Reststickstoff	0,4 "

Aus vorstehenden Aufzeichnungen sowie anderen Versuchen geht hervor, daß Aushalten im Brutschrank mit Zunahme löslichen Stickstoffs einhergeht. Gleichzeitig verändert sich das p_H in der Säure- richtung. Um die Säurebildung zu vermeiden, beschloß ich, denselben Versuch in Pufferlösung zu machen. Dazu verwendete ich ein Gemisch primärer und sekundärer Phosphate mit $p_H = 7,84$. Nachstehend das Versuchsprotokoll:

Puffergemisch ($p_H = 7,84$) — 50,0 ccm + Netz — 10,0 + Toluol 5 ccm, Stickstoffbestimmung an zwei Proben zu je 5,0 ccm.

Probe ungekocht		Probe gekocht	
$p_H = 7,84$		$p_H = 7,84$	
Gesamtstickstoff	1,0 ccm	Gesamtstickstoff	0,1 ccm
Reststickstoff	0 "	Reststickstoff	0 "
Nach 24 Std. Brutschranktemperatureinwirkung:			
Gesamtstickstoff	2,2 ccm	Gesamtstickstoff	0,4 ccm
Nach 2×24 Std. Brutschranktemperatureinwirkung:			
$p_H = 7,84$		$p_H = 7,84$	
Gesamtstickstoff	3,1 ccm	Gesamtstickstoff	0,6 ccm
Reststickstoff	1,2 "	Reststickstoff	0 "

Aus vorstehenden Aufzeichnungen geht hervor, daß in der ungekochten Probe der Stickstoffgehalt mächtig ansteigt, während er ganz unbedeutend zunimmt in der Kochprobe.

Weiterhin habe ich Fibrinverdauungsversuche gemacht. Das Fibrin wurde mit Alkohol-Äthergemisch im Laufe von zweimal 24 Stun-

den vorbehandelt und darauf getrocknet, zuerst im Luftstrom, darauf im Exsikkator. Zur Fermentation diente ein Glycerin-Netzextrakt. Zu dessen Herstellung wurde fein zerteiltes Netz in wässriger Glycerinlösung 1:3 für drei- bis viermal 24 Stunden kaltgestellt. Nach Abgießen der Extraktionsflüssigkeit wurde das Netz mit Quarzsand zerrieben und bei 300 Atmosphären Druck unter der Buchnerpresse abgepreßt, worauf der Preßsaft, mit der abgegossenen Extraktionsflüssigkeit gemischt, durch Watte filtriert und auf Fermentwirkung geprüft wurde. Die Prüfung wurde sowohl in Ringerlösung als auch im Phosphatgemisch ($p_H = 7,34$) gemacht.

In allen Fällen habe ich Zunahme des löslichen Stickstoffs feststellen können. Nachstehend eines der Protokolle.

Probe ungekocht	Probe gekocht
Puffergemisch 50 ccm ($p_H = 7,84$)	Dieselbe Versuchsanordnung
Extrakt 10 "	
Fibrin 0,5 "	
Toluol 5,0 "	
$p_H = 7,84$	$p_H = 7,84$
Stickstoffgehalt des Filtrats . 0,6 "	Stickstoffgehalt 0,2 ccm
Nach 24 Std. Temperatureinwirkung (38°):	
$p_H = 7,84$	$p_H = 7,84$
Stickstoffgehalt 1,4 ccm	Stickstoffgehalt 0,5 ccm

Darauf folgten Versuche mit Peptonspaltung. Die Versuchsanordnung lehnt sich an die Angaben von *Willstätter* und *Leitz*, mit dem Unterschied, daß ich eine wässrige Lösung des Titrieralkalis anstatt einer alkoholischen verwendete. Um starke Verdünnung des Titrats zu vermeiden, nahm ich das Alkali in stärkerer Konzentration, und zwar in Normallösung. Nachstehend eines der Protokolle:

Probe ungekocht	Probe gekocht
Puffergemisch 1,0 ccm ($n-NH_4Cl$ + $n-NH_3$, $p_H = 8,5$)	Dieselbe Versuchsanordnung
Pepton-Witte (3%ig) . . . 0,5 ccm	
Extrakt 0,5 "	
Ein Thymolkristall.	
Vor Titrierung wird diese Lösung mit alcohol. abs. in zehnfacher Menge verdünnt und dann auf eine Reihe Gläser verteilt:	
1. Alkalimenge 0,4 ccm	1a. 0,4 ccm
Nach 2 Std. Temperatureinwirkung (30°):	
2. Alkalimenge 0,6 ccm	2b. 0,4 ccm
Nach 24 Std. Einwirkung (30°):	
3. Alkalimenge 0,6 ccm	3c. 0,4 ccm

Aus diesen Aufzeichnungen und aus anderen Versuchen geht hervor, daß im Netzextrakt ein Wittepepton spaltendes Ferment enthalten ist.

Ich habe auch den Versuch gemacht, in entfettetem Netze proteolytische Fermente nachzuweisen, wobei die Entfettung durch Aceton und Äther, nach der Vorschrift von *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz*, bewirkt wurde. Jedoch das Ergebnis war negativ. Es ist möglich, daß mit den Fettmassen auf rein mechanischem Wege auch die Fermente entzogen wurden. Dagegen hatte der Versuch, die Fermente vermittelt 0,2 %iger Essigsäure zu extrahieren, positiven Erfolg. Nachstehend das Versuchsprotokoll:

Fein zerteiltes und zerriebenes Netz, 30,0 g, wird in 100 ccm 0,2 %iger Essigsäure für 24 Stunden im Brutschrank bei 38° belassen. Darauf Filtration durch Watte, Neutralisierung und Prüfung auf Fermente: 1,0 Filtrat + 1,0 Puffergemisch + 0,5 Pepton + ein Thymolkristall.

$p_H = 8,7$, n NaOH 0,3, nach 24 Stunden 0,5.

Es folgt der Versuch, aus dem Essigextrakt vermittelt Aceton das Ferment zu fällen. Der Niederschlag wird aufgesammelt, getrocknet und in gewöhnlicher Weise geprüft: Niederschlag 0,02 + Puffergemisch ($p_H = 8,7$) 1,0 ccm + Pepton 0,5 ccm + ein Thymolkristall.

n NaOH-Zusatz 0,3.

Nach 24 Stunden Einwirkung bei Brutschranktemperatur 38°:

n NaOH-Zusatz 0,4.

II. Lipolytische Fermente.

Auf lipolytische Fermente machte ich die Prüfung nach *Petrunkin*, und zwar vermittelt Milch und Eigelb. Milch und Eigelb wurden in folgender Weise vorbehandelt: Milch 150 ccm + Chloroform 3 bis 4 Tropfen + Senföl 1 bis 2 Tropfen. Eigelb: Ein Hühnereigelb + Wasser 100 ccm + Toluol 2 ccm. Titrierung mit $n/50$ Alkali. Nachstehend das Versuchsprotokoll: Zu 10,0 ccm der Lösung (Milch, Eigelb) Zusatz von 3,0 ccm Glycerin-Netzextrakt. Anfangssäuregrad ($n/50$ NaOH), für Milch — 2,3, für Eigelb — 4,0. Nach 24 Stunden Zimmertemperatureinwirkung im Dunkeln: Milch — 6,8, Eigelb — 5,0. Kontrolle mit gekochtem Extrakt: Milch — 3,0, Eigelb — 4,1. Wiederholung des Versuchs hatte dasselbe Ergebnis.

III. Amylolytische Fermente.

Bei der Amylaseprüfung ging ich nach *Wohlgemuth* vor, mit dem Erfolge, daß an dem Glycerin-Netzextrakt eine ganz geringe amylytische Wirkung festgestellt werden konnte. Der Extrakt in einer Menge von

0,1 bis 0,8 gab im Laufe einer Stunde keine Spur von Amylumspaltung, und erst 1,0 Extrakt gaben positiven Erfolg.

Zusammenfassung.

1. Im Netze des Hundes habe ich proteolytische Fermente nachweisen können. Dieselben waren nachweisbar in Selbstverdauungsversuchen an diesem Organ und in Versuchen mit Fibrinverdauung und in solchen mit Wittepeptonspaltung.

2. An Netzextrakten habe ich daneben auch lipolytische und sehr schwache amylolytische Wirkung feststellen können.

Literatur.

1) *Effet*, Kubanskij nauchnomediz. Westn. **6**, 1927 (russ.). — 2) *Euler*, Chem. d. Enzyme 1927. — 3) *Heusner*, Münch. med. Wochenschr. 1905, S. 1130. — 4) *Koch*, Zeitschr. f. Hygiene **69** und **91**. — 5) *Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkung, 5. Aufl., 1926. — 6) *Petrunkin*, Russk. fisiol. Journ. **4**, 1921. — 7) *Rona*, Prakt. d. phys. Chem. **1**, 1926. — 8) *Schmidt-Weyland*, Zeitschr. f. Hygiene **167**, H. 2, 1927. — 9) *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz*, Zeitschr. f. phys. Chem. **132**, 181, 1924.

Berichtigung.

In Band 186, 378, 1927 muß die Überschrift lauten:

Untersuchungen über die Zusammensetzung der Zellmembran auf Grund einer neuen Methode zur Charakterisierung der Oberflächenspannungsverhältnisse.

Autorenverzeichnis.

- Adowa, A. N. s. J. A. Smorodinzew.*
Antal, L. s. L. Jendrassik.
Brugsch, Theodor und Hans Horsters.
 Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XXI. Mitteilung: Über Glykose-, Milchsäure- und Phosphorsäurebildung in der Leberaufschwemmung unter dem Einflusse von Insulin. S. 147.
 — — Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XXII. Mitteilung: Versuche über Bildung von Milchsäure in der Leber aus Äpfelsäure, Fumarsäure, Maleinsäure. Von *Tsukio Ibuki*. S. 164.
 — — Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XXIII. Mitteilung: Milchsäurebildung in der Leber nach Durchströmungsversuchen mit d-Fructose. Von *Y. Harada*. S. 172.
 — — Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XXIV. Mitteilung: Über die mangelnde Beeinflußbarkeit der Mutarotation der Glucose und d-Fructose durch Insulin. Von *Paul Radt*. S. 178.
Dobrowitzky, P. J. s. Nikolaus Wwedensky.
Drastich, L. Eine Modifikation des *Barcroft'schen* Blutgasanalysenapparates und zugleich eines Mikrorespirometers. S. 35.
Feldt, Adolf und Rafael Vara-Lopez. Über Beeinflussung der Wasserstoffionenkonzentration des Blutes durch chemotherapeutische Stoffe. S. 112.
Fellenberg, Th. v. Bestimmung organischer Stoffe durch Chromsäureoxydation. S. 365.
 — Über das Verhalten saurer und alkalischer Böden im Joddüngungsversuch. S. 326.
Fellenberg, Th. v. und Dr. (dag). Hans Pacher. Der Jodgehalt der Schilddrüsen verschiedener Rinderrassen und seine Beziehungen zur Beschaffenheit dieser Drüsen. S. 339.
Fränkel, Sigmund und Hermann Prinz. Über das Tryptoporphyrin. S. 90.
Freundlich, H. und G. V. Slottman. Über das Gelten der Traubescen Regel bei der Hydrotropie. S. 101.
Gagarina, E. Zur Methodik der Katalasebestimmung im Blute und in den Tiergeweben. S. 284.
Geldrich, J. Über den Energieverbrauch beim Reiten. S. 1.
Glimm, E. und W. Sommer. Beitrag zur Reinigung der Malzamylase. S. 290.
Gmeiner, Gerh. CO₂- und O₂-Analysen mit dem Haldaneapparat mittels automatischer Schwenkung. S. 285.
Goldberg, J. M. Über Netzfermente. S. 475.
Hafner, E. A. Zur Energetik der Aus-salzung. S. 259.
Harada, Y. s. Theodor Brugsch.
Horsters, Hans s. Theodor Brugsch.
Ibuki, Tsukio s. Theodor Brugsch.
Jacobsohn, Kurt P. s. Carl Neuberg.

- Jendrassik, L. und L. Antal.* Kationen und parasympathische Gifte. Ein Beitrag zur Frage der Zondekschen Theorie. S. 75.
- Kobel, Maria* s. *Carl Neuberg.*
- Krassowitzkaja, S. s. A. Tscharny.*
- Krogh, August und Fusakichi Nakazawa.* Beiträge zur Messung des kolloid-osmotischen Druckes in biologischen Flüssigkeiten. S. 241.
- Kromme, L. de* s. *N. Waterman.*
- Lewinski, W.* s. *J. K. Parnas.*
- Matakas, F.* s. *S. G. Zondek.*
- Mozolowski, Wl.* s. *J. K. Parnas.*
- Müller, Helmut.* Zur Elementaranalyse stickstoffhaltiger Körper. S. 56.
- Nakazawa, Fusakichi* s. *August Krogh.*
- Neuberg, Carl und Maria Kobel.* Quantitative Untersuchungen über den Abbau von Aminosäuren und Aminopurinen durch Methylglyoxal und verwandte Substanzen. S. 197.
- — Weiteres über Abfangverfahren. S. 211.
- Neuberg, Carl und Berta Ottenstein.* Übertritt von Methylalkohol in den Tabakrauch. S. 217.
- Neuberg, Carl, Joachim Wagner und Kurt P. Jacobsohn.* Über die asymmetrische Wirkungsweise der Phosphatase und eine Methode zur biochemischen Darstellung der beiden entgegengesetzt drehenden Alkohole aus ihren Racematen. S. 227.
- Nishikawa, K.* Zur Kenntnis der Takadiastase. S. 386.
- Ottenstein, Berta* s. *Carl Neuberg.*
- Pacher, Hans* s. *Th. v. Fellenberg.*
- Parnas, J. K., Wl. Mozolowski und W. Lewinski.* Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. IX. Mitteilung: Der Zusammenhang des Blutammoniaks mit der Muskelarbeit. S. 15.
- Prinz, Hermann* s. *Sigmund Fränkel.*
- Radt, Paul* s. *Theodor Brugsch.*
- Récsei, A.* Einige orientierende Versuche über die physiologische Wirkung von zwei Disulfonen. S. 405.
- Schultzer, Poul.* Studien über Phosphor- und Calciumstoffwechsel bei mangelhaften Kostformen. I. Mitteilung: Die Einwirkung ultraviolett Lichtes. S. 409.
- Studien über Phosphor- und Calciumstoffwechsel bei mangelhaften Kostformen. II. Mitteilung: Die Einwirkung von Lebertran. S. 427.
- Studien über Phosphor- und Calciumstoffwechsel bei mangelhaften Kostformen. III. Mitteilung: Veränderung des Phosphor- oder Calciumgehalts der Kost. S. 435.
- Sjollema, B.* Zur Blutzuckerfrage. III. Mitteilung: Weiteres über die Nichtglucose der Blutfiltrate. S. 465.
- Slotman, G. V.* s. *H. Freundlich.*
- Smorodinzew, J. A. und A. N. Adowa.* Zur Methodik der Chininbestimmung nach dem Verfahren von *Hartmann und Zila.* S. 279.
- Sommer, W.* s. *E. Glimm.*
- Stasiak, Arenka.* Über die Unwirksamkeit des direkt in den Darm eingeführten Insulins und Versuche zu deren Erklärung. S. 24.
- Suski, P. M.* Über den Einfluß der Verfütterung verschiedener aktiver Eisenverbindungen auf den Verlauf der Avitaminose bei Reistauben. S. 459.
- Tscharny, A. M.* Die Rolle der Lunge im intermediären Stickstoffwechsel. I. Mitteilung: Der Gehalt an Gesamt- und Reststickstoff im rechten Herzen und im arteriellen Blute in der Norm und nach intravenöser Seruminjektion. S. 372.
- Tscharny, A. und S. Krassowitzkaja.* Die Rolle der Lunge im intermediären Stickstoffwechsel. II. Mitteilung: Reststickstoffgehalt des von der isolierten Lunge ab- und zufließenden defibrinierten Blutes. S. 378.

- Utkin-Ljubowzow, L.* Über das Antitrypsin des normalen Serums. S. 134.
- Vara-Lopez, Rafael* s. *Adolf Feldt*.
- Wagner, Joachim* s. *Carl Neuberg*.
- Waltner, K.* Über die Wirkung großer Mengen Eisens. I. Mitteilung: Über die Wirkung des Eisens auf die Knochenentwicklung. S. 381.
- Waterman, N.* und *L. de Kromme*. Untersuchungen über Cytolyse beim Krebs. II. S. 65.
- Wolf, A. C.* Physikalisch-chemische Studien über den Einfluß oberflächenaktiver Stoffe auf Samenzellen (Weizen) und Sporen von *Tilletia tritici*. S. 117.
- Wwedensky, Nikolaus*. Oberflächenenergie einiger physiologischer Flüssigkeiten. I. S. 270.
- Wwedensky, Nikolaus* und *P. J. Dobrowitzky*. Methode zur Bestimmung der lipolytischen Wirkung von Pankreassaft und Blut. S. 448.
- Zondek, S. G.* und *F. Matakas*. Besteht ein ursächlicher Zusammenhang zwischen tonischer Muskelkontraktion und Milchsäurebildung? S. 40.
-

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-Weihenstephan, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedberger-Berlin, E. Friedmann-Berlin, E. Fromm-Wien, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, P. Härl-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, V. Heurl-Zürich, V. Henriques-Kopenhagen, E. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, A. J. Kluyver-Delft, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langsteln-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, E. J. Lesser-Mannheim, P. A. Levene-New York, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, O. Meyerhof-Berlin, L. Michaelis-Baltimore, H. Molisch-Wien, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Omelianski-Leningrad, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, K. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, D. N. Prianschnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, A. Rippel-Göttingen, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-Leningrad, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, A. Schlossmann-Düsseldorf, E. Schmitz-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, C. Tigerstedt-Helsingfors, P. Trendelenburg-Freiburg i. Br., F. Verzár-Debreczen, O. Warburg-Berlin, H. J. Waterman-Delft, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, W. Wlechowki-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau,

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertneunundachtzigster Band



Berlin

Verlag von Julius Springer

1927

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig

Inhalt.

	Seite
Bechhold, H. und L. Kelner. Trennung von Trypsin und Enterokinase durch Ultrafiltration	1
Oparin, A. und N. Pospelowa. Der Fermentgehalt ruhender Weizensamen	18
Kolthoff, J. M. Über die Anwendung von Mischindikatoren in der Acidimetrie und Alkalimetrie	26
Remesow, Igor. Ein neues Vakuum-Widerstandsgefäß für Leitfähigkeitsbestimmung und konduktometrische Maßanalyse	33
Zaleski, W. und Olga Pissarjewsky. Beiträge zur Frage des Hexosenabbaues in der Pflanze. I. Mitteilung: Über den Zymaseapparat der Samen	39
Schmalfuß, Hans und Albert Treu. Über Methyl-n-nonyl-keton aus dem ätherischen Öl der Sojabohne (Glycine soja Sieb)	49
Némec, Antonín. Kolorimetrische Kalibestimmung in wässrigen Bodenausüßen als Indikator der Düngungsbedürftigkeit.	50
Krebs, Hans Adolf. Über den Stoffwechsel der Netzhaut.	57
Kuen, Franz Melnrad. Über die quantitative Bestimmung des Carnosins	60
Dische, Zacharias. Über charakteristische Farbreaktionen der Milchsäure, des Methylglyoxals und der Kohlehydrate mit Carbazol und Schwefelsäure	77
Goldhammer, Helene. Über die Oxydation von Phenol mit Wasserstoff-superoxyd unter Zusatz von Eisensalzen	81
Hirai, Kinsaburo. Über die Synthese des d, l-2, 5-Dioxyphenylalanins	88
Hirai, Kinsaburo und Kumataro Gondo. Über Dopa-Hyperglykämie	92
Zaleski, W. und L. Notkina. Beiträge zur Frage des Hexosenabbaues in der Pflanze. II. Mitteilung: Über den Zustand und die Wirksamkeit des Zymaseapparates der Samen	101
Tamiya, Chichlo. Über den Stoffwechsel der Netzhaut in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung	114
Barrenscheen, H. K., A. Eisler und L. Popper. Beiträge zum Problem des Blutzuckers. VIII. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorkurve. 6. Adrenalin	119
Scharrer, K. Zur Kenntnis der Hydroperoxyd spaltenden Eigenschaft der Böden	125
Forrai, E. Insulin und Fructosediphosphorsäure	150
— Untersuchungen über menschliche Fructosediphosphatase. II.	155
Sivó, Rudolf. Der normale Bilirubinspiegel in menschlichen Seren	159
Sivó, R. und E. Forrai. Physikalisch-chemische Eigenschaften des Bilirubins in Körperflüssigkeiten	162
Sivó, R. und E. Forrai. Über die Zersetzlichkeit von Bilirubinlösungen, zugleich ein Beitrag zum Bilirubinnachweis im Urin	168
Fernau, A. Über die Wirkung der durchdringenden Radiumstrahlung auf Pseudoglobulin	172
Tamiya, Chichlo. Über den Stoffwechsel der Leber in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung	175
Jendrassik, A. und A. G. Keményfi. Zur Kenntnis des D-Vitasterins. I. Mitteilung: Über die Aktivierbarkeit des Cholesterins	180
Kolthoff, J. M. und J. J. Vleeschhouwer. Eine Vervollständigung der Reihe Pufferlösungen im alkalischen Gebiet	191
Krebs, Hans Adolf und Fritz Kubowitz. Über den Stoffwechsel von Carcinomzellen in Carcinomserum und Normalserum	194

	Seite
Heiduschka, A. und H. Tettenborn. Über Galaktoaraban der Lupinensamen. (Vorläufige Mitteilung)	203
Sahashi, Yoshikazu. Synthese der durch Hydrolyse des Roh-Oryzanins entstehenden β -Säure (2, 6-Dioxychinolin-4-carbonsäure)	208
Maurer, Kurt. Über die biochemische Überführung von Oximinobrenztraubensäure in Alanin	216
Schoeller, W., M. Gehrke und S. Michael. Über eine Apparatur zur Messung und Beeinflussung des Gasstoffwechsels von Lebewesen und einige damit erhaltene Ergebnisse	220
Schmalfuß, Hans, Karl Spitzer und Hans Brandes. Kolorimetrische Bestimmung von o-Dioxybenzolen	226
Schmalfuß, Hans, Helene Barthmeyer und Hans Brandes. Warum schwärzen sich die Hülsen von <i>Sarothamnus scoparius</i> Wimm., dem Besenginster?	229
Ozaki, Junichi. Über den relativen Nährwert der Fette. II.	233
Warburg, Otto und Fritz Kubowitz. Stoffwechsel wachsender Zellen (Fibroblasten, Herz, Chorion).	242
Rona, P. und Fr. Chrometzka. Beiträge zur Frage der fermentativen Eiweißsynthese	249
Simon, Alexander. Beitrag zur Frage über das Eingreifen des Thyroxins in den intermediären Zellstoffwechsel	265
Tóth, A. Eine quantitative Mikromethode zur Fraktionierung der Serumeiweißkörper durch Elektrodialyse	270
Jurišić, P. J. Untersuchungen über die Bedeutung der ζ -Potentiale für elektroosmotische Flüssigkeitsüberführung durch Kolloidummembranen. Ein Versuch zu einer neuen Theorie der anomalen Osmose	294
Barrenscheen, H. K. und Robert Berger. Zur Analyse der Insulinwirkung. I. Mitteilung: Die Hemmung der Phosphatausscheidung durch Insulin	302
Barrenscheen, H. K. und Luise Messiner. Eine kolorimetrische Mikrobestimmung des Natriums	308
Doskočil, Ant. Biochemische Beobachtungen über das Wachstum der Typhusbazillen	314
Hepner, Josef und Oktavian Wagner. Insulin und Fettstoffwechsel. Ein Beitrag zur Theorie der Insulinwirkung	322
Rona, P. und H. W. Nicolai. Untersuchungen über die Giftwirkung der Chininkörper auf das Gärvermögen lebender Hefe	331
Behrens, W. U. Die Verteilung der Milchsäure zwischen Wasser und Äther sowie Wasser und Amylalkohol. Bemerkung zu der gleichbetitelten Arbeit von R. Dietzel und E. Rosenbaum	348
Warburg, Otto. Über den Stoffwechsel der Hefe	350
— Über die Wirkung von Kohlenoxyd und Stickoxyd auf Atmung und Gärung	354
Weber, Hans H. Massenwirkungsgesetz und Kolloide	381
— Das kolloidale Verhalten der Muskeleiweißkörper. III. Mitteilung: Physikochemische Konstanten des Myogens	407
Hirsch, Gertrud. Über den Einfluß der Alkalizufuhr auf die alimentäre Glykämie im Hungerzustand	451
Autorenverzeichnis	460

Trennung von Trypsin und Enterokinase durch Ultrafiltration.

Von

H. Bechhold und L. Keiner.

(Aus dem Institut für Kolloidforschung zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 25. Juli 1927.)

Während einige Abbauprodukte von Proteinen (Albuminpepton, Clupein, Thymushiston) nach *Waldschmidt-Leitz*¹ von Trypsin allein verdaut werden, benötigt es zur Spaltung höherer Proteine eines Aktivators, der Enterokinase oder kurz *Kinase*. Die Trennung der Kinase von dem Trypsin erfolgte bisher hauptsächlich nach *Waldschmidt-Leitz* durch Adsorption und Elution. Wir unternahmen es, die Frage zu prüfen, ob etwa die *Verschiedenheit der Teilchengröße* von Enzym und Kinase dazu herangezogen werden könne, diese beiden Bestandteile des Rohtrypsins zu trennen und dabei weitere Aufschlüsse über diese beiden Stoffe zu gewinnen. Ist die Teilchengröße von Enzym und Kinase verschieden, dann muß die Trennung durch *Ultrafiltration* gelingen.

In der Literatur fanden wir recht widersprechende Angaben über das Verhalten von Trypsin gegenüber Membranen. *D. J. Levy*² stellte fest, daß „Pankreatin“ (also das Fermentgemisch, welches auch Trypsin enthält) von der Kollodiummembran stark zurückgehalten werde. Nach den Angaben von *L. Strada*³ und denen von *A. S. Neill*⁴ passiert Trypsin durch Kollodiummembranen. *R. Ehrenberg*⁵ arbeitete mit Pergamentmembranen, die „für einen Teil des wirksamen Enzyms durchlässig waren“ und mit Pergamentmembranen, die enzymundurchlässig waren; im übrigen verfolgten seine Untersuchungen andere Ziele.

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. **149**, 203 ff., 1925.

² Journ. of Infectious diseases **2**, 1 bis 18.

³ Ann. Inst. Pasteur **22**, 982, 1908.

⁴ Amer. Journ. of physiol. **57**, 478, 1921.

⁵ Diese Zeitschr. **149**, 270, 1924.

G. Schaeffer und *E. Terroine*¹, die durch Dialyse des pankreatischen Sekrets gegen Wasser eine Trennung von Trypsin und Erepsin erzielt haben, geben an, daß nach dreitägiger Dialyse die Innenflüssigkeit keine Wirkung mehr auf Eieralbumin habe, wohl aber noch auf Casein, Histon oder Peptonlösung. Nach *Lagrange* und *Suarez*² wird Trypsin vollkommen im Ultrafilter zurückgehalten. Leider sind keinerlei Angaben über die Art der Prüfung gemacht; es wird nicht unterschieden zwischen Ultrafiltrerrückstand und Filtrat. *Waldschmidt-Leitz*³ fand, daß nach achttägiger Dialyse in Fischblase gegen Wasser der Gehalt an Kinase aus Rohextrakt im Dialysierschlauch nicht abgenommen hatte, und daß das Dialysat sich als unwirksam erwies. In einem anderen Versuch findet er⁴, daß nach 48 stündiger Dialyse in Fischblase die enzymatische Wirkung gegen Gelatine auf Null gesunken ist.

R. Fricke, *F. A. Fischer* und *H. Borchers*⁵ machen die bemerkenswerte Feststellung, daß aktives Trypsin imstande ist, unter dem Einfluß eines elektrischen Potentialgefälles noch relativ sehr dichte Kolloidummembranen zu passieren, durch welche andere Kolloide weitgehend zurückgehalten werden. Ultrafiltrierten sie jedoch die Trypsinlösung durch eine 10%ige Membran, ohne die Einwirkung des elektrischen Stromes, dann konnte im Ultrafiltrat keine proteolytische Wirkung mehr festgestellt werden.

Nach dem heutigen Stande der Fermentforschung ist es begreiflicherweise sehr schwer, die verschiedenen Versuchsergebnisse miteinander zu vergleichen. Teilweise war die Prüfungsmethodik früher unzureichend, teilweise die Definition der verwendeten Membrane. Immerhin dürften die von uns erzielten Ergebnisse manche scheinbaren Widersprüche klären.

Für unsere Versuche bedienten wir uns der *Bechhold-Königschen* Ultrafiltrertiegel⁶, die mit einer Eisessigkolloidummembran überzogen waren. Mit ihrer Hilfe gelingt es, aus Trypsin (*Merck*) den kolloiden Anteil von den Kristalloiden in wenigen Stunden auf rein mechanischem Wege zu trennen.

Die Untersuchungen zeigten, daß die *Kinase* von einer 4%igen Membran noch zurückgehalten wurde, während bei einer 3%igen Membran im Filtrat bereits etwas verdauende Wirkung festgestellt wurde. Zwischen diesen beiden Membrandichten liegt somit die Grenze der Durchlässigkeit für Kinase. Eine 4%ige Membran ist durchlässig für Albumin und Hämoglobin; Glutin hingegen wird von ihr zurückgehalten. Somit sind die *Kinaseteilchen* größer als die des Albumins

¹ Journ. de Physiol. et Pathol. gen. 12, 884, 905. 1910.

² C. r. de la Soc. de Biol. 96, 963, 1927.

³ Zeitschr. f. physiol. Chem. 132, 1924.

⁴ Ebendasselbst 147, 286, 1925.

⁵ Kolloidzeitschr. 39, 159, 1926.

⁶ Zeitschr. f. angew. Chem. 1924, Nr. 29.

und Hämoglobins und der Größenordnung nach ähnlich denen der Glutinteilchen.

In zahlreichen Versuchen wurde Rohtrypsin auf dichten Membranen (5- bis 10%ig) ultrafiltriert und mit großen Mengen Wasser ausgewaschen. Dabei zeigte sich, daß der Verdauungseffekt des Ultrafiltrerrückstandes auf etwa $\frac{1}{13}$ gesunken war, während das Enzym das Ultrafilter passiert hatte. Durch Vermischung des Ultrafiltrats mit dem Filtrerrückstand konnte eine weitgehende Reaktivierung erzielt werden. Eine kleine Restaktivität des Ultrafiltrerrückstandes war auch durch weitgehende Auswaschung nicht zu vermindern, sie dürfte wohl durch Adsorption des Trypsins an Kinase zu erklären sein. •

Setzt man einer aktiven Trypsinlösung Albumin zu, so wird die tryptische Wirkung gegen Gelatine stark herabgesetzt (Waldschmidt-Leitz¹). Dies legt die Vermutung nahe, daß das Trypsin durch das Albumin gebunden wird. Diese Annahme bestätigte sich jedoch nicht, denn wir konnten das Trypsin-Albumingemisch durch Ultrafiltration glatt trennen.

Experimenteller Teil.

Zur Verwendung kamen zwei Trypsinpräparate von Merck. In Wasser lösten sie sich leicht bis auf eine Trübung, die bei dem einen in schwach alkalischer Lösung verschwand. Die wässrige Lösung hatte ein $p_H = 5,5$. Bei 110° getrocknet, verlor das erste Präparat 25% Wasser, der Aschegehalt betrug 2,5%. Die Eiweißreaktionen (Biuret und Sulfosalicylsäure) waren positiv; Fehlingsche Lösung wurde stark reduziert.

Die Bestimmung der enzymatischen Wirkung wurde sowohl nach Fuld-Gross² als auch nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz³ ausgeführt. Bei der Fuld-Grossschen Methode wurde in Reihenversuchen zu konstanten Mengen Casein (Hammarsten) (3 ccm 0,1%ige Lösung) steigende Mengen Trypsinlösung gegeben und die Enzymmenge bestimmt, die nach 30 Minuten bei 37° (im Brutschrank) vollständige Verdauung des Caseins bewirkte. Die Flüssigkeiten wurden vor der Mischung auf 37° vorgewärmt. Zur Charakteristik der Verdauung wurde die Lösung durch Essigsäure angesäuert, durch welche unverdautes Casein ausflockt, während verdautes Casein in Lösung bleibt. Um bei möglichst schwach alkalischer Reaktion zu arbeiten, wurde statt einer 0,2%igen eine 0,03%ige Sodalösung gewählt, in der Trypsin und Casein klar löslich waren. Zum Vergleich wurde eine 0,1%ige

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. 147, 300, 1925.

² Siehe Rona, Prakt. d. physiol. Chem., 1. Teil, S. 236, 1926.

³ Ebendasselbst, S. 255.

G. Schaeffer und *E. Terroine*¹, die durch Dialyse des pankreatischen Sekrets gegen Wasser eine Trennung von Trypsin und Erepsin erzielt haben, geben an, daß nach dreitägiger Dialyse die Innenflüssigkeit keine Wirkung mehr auf Eieralbumin habe, wohl aber noch auf Casein, Histon oder Peptonlösung. Nach *Lagrange* und *Suarez*² wird Trypsin vollkommen im Ultrafilter zurückgehalten. Leider sind keinerlei Angaben über die Art der Prüfung gemacht; es wird nicht unterschieden zwischen Ultrafilterrückstand und Filtrat. *Waldschmidt-Leitz*³ fand, daß nach achttägiger Dialyse in Fischblase gegen Wasser der Gehalt an Kinase aus Rohextrakt im Dialysierschlauch nicht abgenommen hatte, und daß das Dialysat sich als unwirksam erwies. In einem anderen Versuch findet er⁴, daß nach 48 stündiger Dialyse in Fischblase die enzymatische Wirkung gegen Gelatine auf Null gesunken ist.

R. Fricke, *F. A. Fischer* und *H. Borchers*⁵ machen die bemerkenswerte Feststellung, daß aktives Trypsin imstande ist, unter dem Einfluß eines elektrischen Potentialgefälles noch relativ sehr dichte Kollodiummembranen zu passieren, durch welche andere Kolloide weitgehend zurückgehalten werden. Ultrafiltrierten sie jedoch die Trypsinlösung durch eine 10%ige Membran, ohne die Einwirkung des elektrischen Stromes, dann konnte im Ultrafiltrat keine proteolytische Wirkung mehr festgestellt werden.

Nach dem heutigen Stande der Fermentforschung ist es begreiflicherweise sehr schwer, die verschiedenen Versuchsergebnisse miteinander zu vergleichen. Teilweise war die Prüfungsmethodik früher unzureichend, teilweise die Definition der verwendeten Membrane. Immerhin dürften die von uns erzielten Ergebnisse manche scheinbaren Widersprüche klären.

Für unsere Versuche bedienten wir uns der *Bechhold-Königschen* Ultrafiltertiegel⁶, die mit einer Eisessigkollodiummembran überzogen waren. Mit ihrer Hilfe gelingt es, aus Trypsin (*Merck*) den kolloiden Anteil von den Kristalloiden in wenigen Stunden auf rein mechanischem Wege zu trennen.

Die Untersuchungen zeigten, daß die *Kinase* von einer 4%igen Membran noch zurückgehalten wurde, während bei einer 3%igen Membran im Filtrat bereits etwas verdauende Wirkung festgestellt wurde. Zwischen diesen beiden Membrandichten liegt somit die Grenze der Durchlässigkeit für Kinase. Eine 4%ige Membran ist durchlässig für Albumin und Hämoglobin; Glutin hingegen wird von ihr zurückgehalten. Somit sind die *Kinaseteilchen* größer als die des Albumins

¹ Journ. de Physiol. et Pathol. gen. **12**, 884, 905. 1910.

² C. r. de la Soc. de Biol. **96**, 963, 1927.

³ Zeitschr. f. physiol. Chem. **132**, 1924.

⁴ Ebendasselbst **147**, 286, 1925.

⁵ Kolloidzeitschr. **39**, 159, 1926.

⁶ Zeitschr. f. angew. Chem. 1924, Nr. 29.

und Hämoglobins und der Größenordnung nach ähnlich denen der Glutinteilchen.

In zahlreichen Versuchen wurde Rohtrypsin auf dichten Membranen (5- bis 10%ig) ultrafiltriert und mit großen Mengen Wasser ausgewaschen. Dabei zeigte sich, daß der Verdauungseffekt des Ultrafiltrerrückstandes auf etwa $\frac{1}{13}$ gesunken war, während das Enzym das Ultrafilter passiert hatte. Durch Vermischung des Ultrafiltrats mit dem Filtrerrückstand konnte eine weitgehende Reaktivierung erzielt werden. Eine kleine Restaktivität des Ultrafiltrerrückstandes war auch durch weitgehende Auswaschung nicht zu vermindern, sie dürfte wohl durch Adsorption des Trypsins an Kinase zu erklären sein.

Setzt man einer aktiven Trypsinlösung Albumin zu, so wird die tryptische Wirkung gegen Gelatine stark herabgesetzt (Waldschmidt-Leitz¹). Dies legt die Vermutung nahe, daß das Trypsin durch das Albumin gebunden wird. Diese Annahme bestätigte sich jedoch nicht, denn wir konnten das Trypsin-Albumingemisch durch Ultrafiltration glatt trennen.

Experimenteller Teil.

Zur Verwendung kamen zwei Trypsinpräparate von Merck. In Wasser lösten sie sich leicht bis auf eine Trübung, die bei dem einen in schwach alkalischer Lösung verschwand. Die wässrige Lösung hatte ein $p_H = 5,5$. Bei 110° getrocknet, verlor das erste Präparat 25% Wasser, der Aschegehalt betrug 2,5%. Die Eiweißreaktionen (Biuret und Sulfosalicylsäure) waren positiv; Fehlingsche Lösung wurde stark reduziert.

Die Bestimmung der enzymatischen Wirkung wurde sowohl nach Fuld-Gross² als auch nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz³ ausgeführt. Bei der Fuld-Grossschen Methode wurde in Reihenversuchen zu konstanten Mengen Casein (Hammarsten) (3 ccm 0,1%ige Lösung) steigende Mengen Trypsinlösung gegeben und die Enzymmenge bestimmt, die nach 30 Minuten bei 37° (im Brutschrank) vollständige Verdauung des Caseins bewirkte. Die Flüssigkeiten wurden vor der Mischung auf 37° vorgewärmt. Zur Charakteristik der Verdauung wurde die Lösung durch Essigsäure angesäuert, durch welche unverdautes Casein ausflockt, während verdautes Casein in Lösung bleibt. Um bei möglichst schwach alkalischer Reaktion zu arbeiten, wurde statt einer 0,2%igen eine 0,03%ige Sodalösung gewählt, in der Trypsin und Casein klar löslich waren. Zum Vergleich wurde eine 0,1%ige

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. 147, 300, 1925.

² Siehe Rona, Prakt. d. physiol. Chem., 1. Teil, S. 236, 1926.

³ Ebendasselbst, S. 255.

Lösung des Trypsin-Ausgangsmaterials angewandt und deren Aktivität bestimmt. Als Beispiel führen wir hier eine Tabelle vollständig an:

Kontrolle (0 Trypsin).	0
0,1 cem Trypsinlösung.	0 bis +
0,2 „ „	0 „ +
0,3 „ „	+ „ 0
0,4 „ „	+ „ ++
0,5 „ „	++ bis +++
0,6 „ „	++ „ +++
0,7 „ „	+++ bis ++
0,8 „ „	fast +++
0,9 „ „	+++

Es bedeutet: 0 = dicker, schnell ausfallender Niederschlag,
 + = langsam ausflockender Niederschlag,
 ++ = Trübung,
 +++ = klare Lösung (vollständige Verdauung).

Bei der *Willstätter-Waldschmidt-Leitzschen* Methode wird zu einer großen Menge Proteinlösung eine relativ geringe Menge Enzym gegeben und bei 30° 1 Stunde lang einwirken gelassen. Absolut genommen, sind jedoch die benötigten Enzymmengen weit größer als bei der *Fuld-Grossschen* Methode. Der Grad der Verdauung wird titrimetrisch in 90 % alkoholischer Lösung an dem Aciditätszuwachs mit alkoholischer 0,2 n KOH gemessen (Indikator Thymolphthalein). Hier wird also, im Gegensatz zu *Fuld-Gross*, nicht der Endpunkt der Verdauung bestimmt, sondern ein erster Abschnitt der Verdauung, in dem Hemmung durch Spaltstücke und p_H -Veränderungen noch keine eingreifende Rolle spielen.

Die Trennung der Trypsinkomponenten durch Ultrafiltration.

25 cem einer 0,2 %igen Trypsinlösung (*Merck*) wurden auf einem 7,5 %igen, eiweißdichten Ultrafilter auf 5 cem eingeeengt; der Inhalt wurde herausgespült und auf 50 cem aufgefüllt, so daß bei der Annahme, das Enzym habe die Membran nicht passiert, eine 0,1 %ige Lösung entstand. Vollständige Verdauung trat erst nach Zugabe von 1,5 cem dieser Lösung ein. Die *Aktivität* war also, im Vergleich zur 0,1 %igen Ausgangstrypsinlösung *gesunken*, denn von dieser hatten 0,9 cem genügt. Das *Ultrafiltrat* zeigte *keine tryptische Wirkung*.

Nun wurde 0,1 g Trypsin auf einem 7,5 %igen Ultrafilter so lange ausgewaschen, bis im Filtrat keine wägbaren Mengen mehr vorhanden waren. Hierzu waren 200 cem Wasser nötig. Der Sicherheit halber wurde noch mit weiteren 100 cem Wasser nachgewaschen. Durchlaufzeit der 300 cem Wasser: 6 Stunden.

Der Ultrafilterinhalt wurde auf etwa 3 ccm eingeeengt, unter Abwischen der Membran herausgespült und auf 10 ccm aufgefüllt, so daß (vorausgesetzt, daß das Enzym zurückgehalten war) eine 1 %ige Trypsinlösung entstand. Diese Lösung reagierte auf Lackmus neutral, war farblos (während die Ausgangslösung gelblich war) und zeigte eine milchige Trübung, die sich in verdünntem Alkali löste. Die Eiweißreaktionen waren positiv. Der Gehalt an Trockensubstanz betrug nur mehr 2,8 % der ursprünglich in der Lösung vorhandenen Menge. Der Aschengehalt, der vorher 2,5 % betrug, war auf Null gesunken; Fehlingsche Lösung wurde nicht mehr reduziert.

Die Prüfung der Aktivität ergab erst bei Zugabe von 1,2 ccm völlige Verdauung. Es hatten also nach der Ultrafiltration 1,2 ccm 1 %iger Enzymlösung denselben Effekt, wie 0,9 ccm der 0,1 %igen Originallösung. Durch erschöpfendes Auswaschen auf dem Ultrafilter war somit die Aktivität auf etwa 8 % ihres ursprünglichen Wertes gesunken (vorausgesetzt, daß bei wechselnder Enzymkonzentration und wechselndem Verhältnis von Enzym zu Casein die Enzymmenge proportional der verdauten Caseinmenge ist). Dagegen war die Aktivität, bezogen auf den Trockengehalt, auf etwa das Dreifache gestiegen.

Ein weiterer Versuch, bei dem mit 500 ccm Wasser ausgewaschen wurde, ergab das gleiche Resultat (vollständige Verdauung mit 1,2 ccm Lösung). Somit verbleibt dem Rückstand im Ultrafilter eine konstante Restaktivität, die auch durch verlängertes Auswaschen nicht beseitigt werden kann.

Die starke Verminderung der Enzymwirkung durch erschöpfendes Auswaschen auf dem Ultrafilter, dazu die gänzliche Inaktivität des Filtrats, legten es nahe, in dem Filtrat den zweiten wirksamen Bestandteil des Rohtrypsins zu suchen. Zu diesem Zweck wurden gemischt: 0,2 ccm Ultrafilterrückstand aus einer erschöpfend ausgewaschenen 1 %igen Trypsinlösung (die für sich eine kaum merkliche Verdauungskraft besaß) mit dem Ultrafiltrat einer 0,2 %igen Trypsinlösung, das unwirksam war.

0,2 ccm Ultrafilterrückstand	0 bis +
2,0 „ Ultrafiltrat	0
0,2 „ Ultrafilterrückstand + 0,3 ccm Ultrafiltrat	+++ bis ++
0,2 „ „ + 0,6 „ „	fast ++
0,2 „ „ + 0,9 „ „	+++

Somit konnte durch Mischung von Ultrafilterrückstand und Ultrafiltrat Reaktivierung des Enzyms erzielt werden, deren Grad abhängig war von der Menge des zugesetzten Ultrafiltrats.

Noch auffälliger war die Reaktivierung in folgendem Versuch:

0,1 g Rohtrypsin, gelöst in 50 ccm Wasser, wurden durch ein 7,5 %iges Ultrafilter filtriert. Nach Beseitigung von 10 ccm Vorlauf

wurde der Rest des Ultrafiltrats aufgefangen. Der Ultrafiltrerrückstand wurde dann mit 300 ccm Wasser ausgewaschen und auf 10 ccm aufgefüllt. Rückstand und Ultrafiltrat (nicht Waschwasser) wurden gemischt (Verhältnis 1 + 4) und eine halbe Stunde bei 30° stehen gelassen. Mit 0,7 ccm dieser Mischung wurde komplette Verdauung erzielt. Die Mischung setzte sich zusammen aus 0,14 ccm des Ultrafiltrerrückstandes aus der ursprünglich 1 %igen Rohtrypsinlösung (fast keine tryptische Wirkung) und 0,56 ccm Ultrafiltrat (keine Enzymwirkung auf Casein).

Tritt die Kinase oder das Trypsin durch das Ultrafilter?

Nachdem in obigem gezeigt war, daß durch Ultrafiltration das Rohtrypsin in seine beiden Komponenten zerlegt werden kann, drängte sich die Frage auf, welcher von den beiden Bestandteilen das Trypsin, welcher die Kinase ist.

Durch die Forschungen von *E. Waldschmidt-Leitz* und *A. Harten-¹* ist bekannt, daß Histon, Clupein und Pepton auch von Trypsin allein verdaut wird. Ein Verdauungsversuch mit dem gegen Casein vollkommen unwirksamen Ultrafiltrat an Pepton mußte darüber die Entscheidung bringen.

1 ccm frisch dargestelltes Ultrafiltrat einer 20 %igen Rohtrypsinlösung wurde einwirken gelassen auf 5 ccm 3 %iger Peptonlösung (Pepton ex albumine *Merck*). Temperatur 30°, Zeit 3 Stunden; $p_H = 8,7$ (eingestellt durch 1 ccm Ammoniak-Ammoniumchloridpuffer); Aciditätszuwachs: 0,07 ccm 0,2 n KOH.

Somit hatte das *Trypsin* die *Ultrafiltermembran* passiert und die *Kinase* war von der Membran zurückgehalten worden.

Aus der Dichte der Membran ergab sich zugleich, daß die *Kinase* teilchen *ähnliche Dimensionen* wie die des *Glutins* besitzen, während *Trypsin* bereits an der Grenze der *Semikolloide* steht, wenn es *nicht* gar *kristalloid* ist (vgl. S. 15), denn selbst bei der Ultrafiltration durch 10 %ige Membranen zeigten Ultrafiltrat und Ultrafiltrerrückstand keinen Unterschied in der Aktivität bei Zusatz der gleichen Menge Kinase.

Die Restaktivität.

Bereits auf S. 5 hatten wir erwähnt, daß im Ultrafiltrerrückstand eine Restaktivität zurückgeblieben war, die auch durch erschöpfendes Auswaschen nicht entfernt werden konnte. Da die dort benutzte *Fuld-Grosssche* Methode keinen genau quantitativen Einblick in die Höhe

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. 149, 203, 1925.

der Restaktivität gewährt, bestimmten wir die Restaktivität auch nach der *Willstätter-Waldschmidt-Leitzschen* Methode.

In zwei getrennten Versuchen wurden je 10 ccm einer 10%igen Rohtrypsinlösung (*Merck*) auf einem 10%igen Ultrafilter mit 500 ccm Wasser bzw. n/20 Ammoniak ausgewaschen, das Ammoniak durch Auswaschen mit Wasser entfernt und die Flüssigkeit zum Schluß auf ihr ursprüngliches Volumen gebracht. Von beiden Ultrafilterrückständen wurden je 1 ccm in der beschriebenen Weise auf 3%ige Gelatinelösung wirken gelassen. Aciditätszuwachs: 0,27 bzw. 0,28 ccm 0,2 n KOH. Auf Grund unserer Eich-tabelle entspricht dies *16 bis 17% Restaktivität* (die *Fuld-Grosssche* Methode hatte 8% ergeben).

Durch obigen Versuch ist erwiesen, daß durch Auswaschen mit Wasser wie auch mit n/20 Ammoniak die gleiche Restaktivität erreicht wird. Das Auswaschen mit verdünntem Ammoniak hat den Vorteil, daß die entstehende Trübung in Lösung geht und eine Verstopfung der Poren verhindert wird.

Es wurde nun versucht, durch *saures Auswaschen* die Restaktivität zu entfernen: 0,1 g Rohtrypsin *Merck* wurde in 50 ccm n/100 HCl gelöst und auf einer 7,5%igen Ultrafiltermembran filtriert; dann mit 200 ccm n/100 HCl ausgewaschen und schließlich mit so viel Wasser nachgespült, bis das Waschwasser mit AgNO₃ keine Trübung mehr gab. (Dauer der Ultrafiltration 12 Stunden.) Nach Auffüllen des Tiegelinhalts auf 10 ccm wurde seine tryptische Wirkung nach *Fuld-Gross* untersucht: 1,2 ccm gab mit 3 ccm Caseinlösung vollkommene Verdauung.

Da das Auswaschen mit *reinem Wasser*, ebenso wie mit n/20 Ammoniak und n/100 Salzsäure, die *gleiche Restaktivität* im Ultrafilterrückstand ergaben, so müssen wir schließen, daß ein Trypsinrest, entsprechend 16 bis 17% der ursprünglichen Aktivität, sehr fest an die Kinase gebunden oder von ihr adsorbiert ist. Da *Waldschmidt-Leitz* eine Kinase gewonnen hat, welcher jede tryptische Wirkung abging, so ist nicht anzunehmen, daß unserer Kinase eine geringe tryptische Wirkung zukommt.

Zerstörung des Trypsins beim Altern.

Wiederholt war uns aufgefallen, daß nach Vereinigung von Ultrafiltrat und Ultrafilterrückstand nicht immer die gleiche Erhöhung der enzymatischen Wirkung eintrat, ja, daß dieselbe mitunter ganz ausblieb. Da die Restaktivität sich als konstant erwies, so mußten wir schließen, daß das Ultrafiltrat, also das in ihm befindliche Trypsin, sich verändert hatte. Folgender Versuch bestätigte diese Annahme:

Eine 20 %ige Rohtrypsinlösung wurde ultrafiltriert; das Filtrat davon wurde mit einer ausgewaschenen Kinaselösung versetzt. Diese Mischung wurde auf 5 ccm 3 %ige Gelatinelösung + 1 ccm Puffer 60 Minuten lang bei 30° einwirken gelassen. 2. und 3. waren behufs Aktivierung zunächst 30 Minuten bei 30° belassen.

Kinase-Trypsinlösung mit Restaktivität	Tryptische Wirkung, gemessen am Aciditätszuwachs
1 ccm + 1 ccm Wasser	} 0,34 ccm 0,2 n KOH
1 " + 1 " Ultrafiltrat, 2 1/2 Tage alt	
1 " + 1 " " 1 Tag alt	
	0,53 " 0,2 n "

Somit war das Trypsin in 2 1/2 Tagen vollkommen zerstört, während ausgewaschene Kinase, also auch das an der Kinase fester haftende Trypsin, mindestens 8 Tage lang die ursprüngliche Aktivität beibehält. Hieraus ergibt sich, daß das Enzym, welches in direkter Verbindung mit dem kolloiden, haltbaren Aktivator steht, also der nicht auswaschbare Anteil, eine erheblich längere Lebensdauer hat, als das in ungebundenem, auswaschbarem Zustande befindliche Enzym.

Diese Ergebnisse dürfen als eine Ergänzung betrachtet werden zu den Angaben von *Waldschmidt-Leitz*, der die Haltbarkeit der Kinase feststellte und zu den Forschungen von *A. Fodor* und seinen Mitarbeitern¹, wonach „der Träger der Fermentwirkung, losgelöst von der Hauptmasse des Proteins, sehr empfindlich und vergänglich“ ist.

Es sei betont, daß stets in sterilen Gefäßen gearbeitet wurde, daß die Trypsinlösung im Eisschrank aufbewahrt war und daß sie sich nach 2 1/2 Tagen als vollkommen klar und geruchlos erwies, daß bakterielle Veränderung nicht in Frage kommt und die Abnahme der enzymatischen Kraft nur auf das Altern in Abwesenheit des Aktivators zurückzuführen ist.

Albuminhemmung.

Beim Auswaschen von Rohtrypsin auf dem Ultrafiltrertiegel mit Wasser entsteht im Ultrafiltrerrückstand eine starke Trübung, die sich abzentrifugieren läßt. Sie dürfte identisch sein mit den Niederschlägen, welche *Fricke*, *Fischer* und *Borchers* (l. c.) bei der Elektrodialyse von Trypsin erhielten. Der Niederschlag gibt die Biuretreaktion und ist ein Protein, das bei alkalischer Reaktion löslich, bei neutraler und salzsaurer Reaktion unlöslich ist. Beim Auswaschen der Rohtrypsinlösung von $p_H = 5,5$ wird der Tiegelinhalt neutral und jener Eiweißkörper fällt aus.

¹ *A. Fodor, A. Bernfeld und R. Schönfeld, Kolloidzeitschr. 87, 32 bis 37, 159 bis 168, 1925.*

Dieses Protein hemmt die enzymatische Wirkung des nach dem Auswaschen der Rohtrypsinlösung im Ultrafilter verbleibenden *Kinase-Trypsinkomplexes*; denn nach dem Abzentrifugieren der Trübung waren nur mehr 0,6 ccm nötig gegenüber 1,2 ccm der proteinhaltigen Lösung, um denselben Verdauungseffekt (nach *Fuld-Gross*) zu erzielen.

Da nach Entfernung der Proteinkörper aus der Drüsensubstanz die enzymatische Wirkung des ausgewaschenen *Kinase-Trypsinkomplexes* stieg, war es von Bedeutung, festzustellen, ob durch weiteren Zusatz eines Proteins eine noch stärkere Hemmung der tryptischen Wirkung auftrat.

Der folgende Versuch zeigt, daß die an den *Kinase-Trypsinkomplex* gebundene Restaktivität durch Zusatz von elektroultrafiltriertem Albumin *nicht* beeinflusst wurde.

1,2 ccm ausgewaschene Kinase-Trypsinlösung (Restaktivität)	+++
1,2 „ ausgewaschene Kinase-Trypsinlösung + 0,025 g Albumin (nach <i>Fuld-Gross</i>)	+++

Da 1,2 ccm ausgewaschene Kinase-Trypsinlösung 0,03 g Trockensubstanz enthalten, die nur zum Teil aus Proteinen besteht, so wurde durch den Zusatz des Albumins der Proteingehalt etwa verdoppelt. Somit genügte der aus der Drüsensubstanz stammende Proteingehalt, um die Aktivität bis auf eine bestimmte Grenze herabzumindern, und der Zusatz von Albumin war wirkungslos.

Hingegen *sank* die enzymatische Wirkung des *Rohtrypsins* nach *Albuminzusatz beträchtlich*¹. Zur Ausführung des Versuchs gingen wir von einer 1%igen Rohtrypsinlösung aus. Zu je 25 ccm dieser Lösung wurde in steigenden Mengen Albumin hinzugesetzt. Bei dem Vermischen entstand ein Niederschlag, der durch Neutralisation mit Sodalösung in Lösung ging. Ein Verdauungsversuch nach *Fuld-Gross* ergab folgendes Resultat:

	Komplette Lösung
25 ccm 1%iges Rohtrypsin + 0,1 g Albumin	0,5 ccm
25 „ 1 „ „ + 0,25 g „	0,5 „
25 „ 1 „ „ + 0,1 g „	
Niederschlag von der Lösung abzentrifugiert	0,3 „
1%iges Rohtrypsin ohne Zusatz	0,09 „

Nach Zugabe von 0,1 g Albumin zum Rohtrypsin tritt also eine Hemmung ein, die auch durch Zugabe von mehr als der doppelten

¹ Vgl. auch *E. Waldschmidt-Leitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 147, 286, 1925.

Menge Albumin nicht weiter erhöht wird. Wie bei der ausgewaschenen Kinase-Trypsinlösung durch Abzentrifugieren des proteinartigen Körpers die enzymatische Wirkung erhöht wurde, so konnte auch hier nach Entfernen des Albuminniederschlags eine Steigerung der tryptischen Wirkung erzielt werden.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß offenbar eine quantitative Beziehung besteht zwischen Trypsin-Kinase und Protein, welches die Enzymwirkung hemmt.

Wie schon früher gezeigt, wird bei der Ultrafiltration die kolloide Kinase vollkommen, das Trypsin nur teilweise zurückgehalten. Dieser Umstand deutet darauf hin, daß in der angewandten Rohtrypsinlösung neben freiem auswaschbarem Trypsin noch solches vorhanden ist, das in engerer Beziehung zur Kinase steht und von dieser festgehalten wird. Daß jedoch die Bindung von Enzym und Aktivator noch sehr locker ist, geht aus den Versuchen von *E. Waldschmidt-Leitz*¹ hervor, dem es gelungen ist, mittels seiner Adsorptionsmethode beide vollständig zu trennen, also Kinase wie auch Enzym frei von jeder enzymatischen Wirkung auf Proteine zu erhalten.

Die Frage, ob die Hemmung durch *Adsorption des Trypsins an Albumin* bedingt ist, oder ob, wie *E. Waldschmidt-Leitz* annimmt, nur eine „*Blockierung*“ des Trypsins vorliegt, ließ sich durch unsere Methode entscheiden.

Der Nachweis einer Adsorption wäre erbracht, wenn das Ultrafiltrat eines Trypsin-Albumingemisches sich nach Vereinigung mit der ausgewaschenen Kinase als völlig inaktiv erwies, also keine Steigerung der Restaktivität bewirkte.

Zu diesem Zwecke wurde Albumin *einmal zum Rohtrypsin*, das *andere Mal zum Ultrafiltrat* einer Trypsinlösung gegeben und die Mischungen ultrafiltriert.

10 ccm 0,5%ige *Rohtrypsinlösung* mit einem Gehalt von 2,5 % Albumin wurden ultrafiltriert. Nach 3 ccm Vorlauf wurde der Rest aufgefangen. 5 ccm dieses Ultrafiltrats wurden zu 5 ccm ausgewaschener Kinaselösung gegeben und nach *Fuld-Gross* die enzymatische Wirkung der Mischung bestimmt. Komplette Lösung mit 0,7 ccm, entsprechend einem Gehalt von 0,35 ccm ausgewaschener Kinaselösung (schwacher tryptischer Effekt), und 0,35 ccm Ultrafiltrat (keine Wirkung auf Casein). Demnach war durch kombinierte Wirkung beider Bestandteile eine *Erhöhung der Aktivität* eingetreten, also das Ultrafiltrat war enzymhaltig. Die *Trennung des Trypsins vom Albumin gelang durch Ultrafiltration trotz Anwesenheit von Kinase*.

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. 149, 221, 1925.

Im folgenden Versuch wurde zu je 20 ccm *Ultrafiltrat* einer 0,5 %igen Trypsinlösung (die Kinase ist also abgetrennt) gegeben: 20, 2,5 und 0,25 ccm 2,5 %iger Albuminlösung. Jede der Lösungen wurde auf 40 ccm aufgefüllt und ultrafiltriert. Je 5 ccm des Ultrafiltrats wurden mit 5 ccm ausgewaschener Kinaselösung versetzt und das Gemisch nach *Fuld-Gross* geprüft. Bei allen kompletten Lösungen mit 0,7 ccm der Mischungen.

Hieraus ergibt sich, daß *unabhängig von der zugesetzten Albuminmenge das Enzym abfiltriert werden kann, gleichviel ob Kinase anwesend ist oder nicht*. Demnach haben sich *Enzym und Albumin nicht zu einem festen Komplex vereinigt*. Die Annahme, daß sich das *Albumin nur zwischen Kinase und Enzym schiebt*, ist somit *bestätigt* (vgl. auch S. 17).

Bestätigung der Ergebnisse an einem anderen Trypsinpräparat.

Die vorausgehenden Versuche waren sämtlich an einem Trypsinpräparat von *Merck* gewonnen. Um festzustellen, ob sie auch für andere Trypsinpräparate Gültigkeit haben, untersuchten wir ein weiteres Präparat von *Merck*, jedoch anderer Provenienz; wir wollen es *Rohtrypsin (Merck) Nr. 2* nennen.

Rohtrypsin (Merck) Nr. 2.

Eigenschaften: Löst sich nur teilweise in Wasser, mit hellgelber Farbe; auch in verdünnten Alkalien ist die Löslichkeit nicht verbessert.

p_H der Lösung = 6,0

Aschegehalt des Rohtrypsins (bei 107° getrocknet) 7,3 %

„ „ Ultrafiltrerrückstandes nach dem Auswaschen 0,3 %

Die im folgenden gemachten Angaben über die Enzymwirkung sind sämtlich nach *Willstätter-Waldschmidt-Leitz*.

Aktivität des Rohtrypsins (Merck) Nr. 2.

1 ccm 10 %iger Lösung: Aciditätszuwachs 0,78 ccm 0,2 n KOH.

Restaktivität.

10 ccm 10 %iger Rohtrypsinlösung (*Merck*) Nr. 2 wurden auf 10 %igem Ultrafilter mit 500 ccm n/20 Ammoniak, dann mit 100 ccm Wasser gewaschen; schließlich wurde der Tiegelinhalt wieder auf 10 ccm aufgefüllt.

Aktivität des Ultrafiltrerrückstandes.

1 ccm: Aciditätszuwachs 0,45 ccm 0,2 n KOH.

Der Trockenrückstand des *ausgewaschenen Ultrafilterinhalts* (bei 107° getrocknet) betrug 3,56 % des angewandten Rohtrypsins; Eiweißreaktion stark positiv; Reaktion mit *Fehlingscher* Lösung negativ (das Rohtrypsin *Merck* Nr. 2 zeigte ebenso wie das frühere Präparat positive *Fehlingsche* Reaktion).

Reaktivierung durch Mischung von Ultrafiltrat und Ultrafiltrerrückstand.

50 ccm 10 %iger Trypsinlösung wurden durch eine 10 %ige Ultrafiltermembran filtriert. 15 ccm Vorlauf wurden verworfen. Dann wurde 1 ccm Ultrafiltrat gemischt mit 1 ccm ausgewaschenem Filterrückstand.

Aciditätszuwachs: 0,70 ccm 0,2 n KOH.

Da der Versuch so rasch durchgeführt wurde, daß eine Veränderung des Trypsins ausgeschlossen ist, so ist die kleine Abnahme an Aciditätszuwachs (0,70 statt 0,78) wohl auf Adsorption von Trypsin in der Membran zurückzuführen.

Es war jedoch durch Mischung der beiden Bestandteile fast vollkommene Reaktivierung erzielt.

Trypsin im Ultrafiltrat.

Auch an diesem Präparat wurde die enzymatische Wirkung des (Casein und Gelatine nicht spaltenden) Ultrafiltrats auf Pepton als Substrat geprüft:

1. Aktivität des Rohtrypsins: 1 ccm 10 %iger Rohtrypsinlösung wurden auf Pepton wirken gelassen; Aciditätszuwachs 0,32 ccm 0,2 n KOH.

2. Aktivität des Ultrafiltrats: 1 ccm Ultrafiltrat einer 10 %igen Trypsinlösung wurden auf Pepton wirken gelassen; Aciditätszuwachs 0,07 ccm 0,2 n KOH.

Nach Abtrennung der Kinase (Ultrafiltrerrückstand) vom Enzym (Ultrafiltrat) war die tryptische Wirkung des Ultrafiltrats erwartungsgemäß gesunken, entsprechend den Angaben von *E. Waldschmidt-Leitz*, daß aktiviertes Trypsin eine höhere Aktivität auf Pepton besitzt als das Enzym allein.

Kinase passiert bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion die eiweißdichte Membran, wenn zur Neutralisation KOH benutzt wird.

20 ccm 20 %iger Rohtrypsinlösung wurden mit n KOH lackmusneutral gemacht und auf einem 10 %igen Ultrafilter filtriert. Nach 10 ccm Vorlauf wurde von den nächsten 5 ccm Ultrafiltrat die enzymatische Wirkung geprüft. 1 ccm ergab (auf Gelatine als Substrat) Aciditätszuwachs von 0,8 ccm 0,2 n KOH.

Das Ultrafiltrat zeigte starke Aktivität auf Gelatine, demnach muß neben dem Trypsin auch die Kinase das Ultrafilter passiert haben. Die Membran wurde nach dem Versuch auf ihre Durchlässigkeit untersucht; sie war vollkommen eiweißdicht.

In gleicher Weise wurden 20 ccm 20%iger Trypsinlösung mit n Ammoniak neutralisiert und die neutrale Lösung ultrafiltriert. Das Ultrafiltrat zeigte keine enzymatische Wirkung.

In zwei weiteren Versuchen wurden je 10 ccm 20%iger Trypsinlösung einmal mit n/1 KOH, das andere Mal mit n/1 NH_4OH schwach alkalisch gemacht (rotes Lackmuspapier wurde gerade gebläut) und ultrafiltriert. Die Filtrate wurden auf eine 0,1%ige Caseinlösung bei 37° wirken gelassen.

Ultrafiltrat + KOH	aktiv
„ + NH_4OH	inaktiv

(Nach 18 Stunden im Brutschrank konnte nach Zusatz von Sulfosalicylsäure das unverdaute Casein ausgefällt werden.)

Dieselben Verhältnisse fanden wir auch beim Albumin.

Je 20 ccm 2%iger Albuminlösung wurden einmal mit n/1 KOH, das andere Mal mit n/1 NH_4OH lackmusneutral gemacht¹.

Ultrafiltrat + KOH	eweißhaltig
„ + NH_4OH	kein Eiweiß

Beide Ultrafilter wurden vorher auf ihre Durchlässigkeit untersucht. Diese Ergebnisse erinnern an die Dispersitätserhöhung, welche O. Risse bei der Ultrafiltration von Globulin, Albumin und Hämoglobin bei Erhöhung des p_H über den isoelektrischen Punkt fand.

Aus den Versuchen geht hervor, daß die Teilchenverkleinerung nicht nur durch die neutrale oder schwach alkalische Reaktion bedingt ist, sie beruht vielmehr auf der spezifischen Wirkung des Kations, wie wir hier gesehen haben, des Kaliums.

Zusammenhang der früheren Untersuchungen mit den unsrigen.

Aus den hier mitgeteilten Ergebnissen zeigt sich, daß jede Trennung von Trypsin durch eine Membran, sei es durch Dialyse, sei es durch Ultrafiltration, zu einer Schwächung oder Vernichtung der verdauenden Wirkung führen muß, auch dann, wenn sie nicht durch Alterung herbeigeführt ist, da Trypsin und Kinase getrennt werden. Die Mehrzahl der Forscher hat diese Möglichkeit der Trennung von Trypsin und Kinase teils nicht gekannt, teils nicht berücksichtigt, woraus sich viele Unklarheiten ergeben.

Zieht man die mangelhafte Versuchs- und Prüfungstechnik in Rechnung, so hat F. Strada bereits im Jahre 1908 Feststellungen

¹ Pflügers Arch. 212, 375 ff., 1926.

gemacht, die weitgehend durch unsere Versuche eine Erklärung finden. Er stellte geringe Aktivität des Filtrats von aktiviertem, frischem Pankreassaft durch Kollodiumsäckchen fest. Eine reinliche Trennung von Trypsin und Kinase ist ihm somit nicht geglückt, wohl aber eine teilweise. Durch Zusatz von Kinase konnte er die Aktivität des Filtrats steigern und durch den Inhalt des Kollodiumsäckchens inaktives Pankreassekret aktivieren. Auch mußte ihm bei der primitiven Versuchstechnik eine Restaktivität entgehen.

Die Ergebnisse von *Schaeffer* und *Terroine* erfahren bereits durch *Waldschmidt-Leitz*¹ eine Kritik; letzterer nimmt an, daß durch Dialyse keine Trennung der Komponenten Erepsin und Trypsin erzielt werde. Nach unseren Versuchsergebnissen läßt sich die von *Schaeffer* und *Terroine* beobachtete Herabminderung der Aktivität des Trypsins im Dialysierschlauch auch dadurch erklären, daß das Enzym die Membran passiert.

Die Dialyseergebnisse von *Waldschmidt-Leitz* decken sich mit unseren Ultrafiltrationsergebnissen; er findet, daß die Kinase nicht dialysiert und daß das Dialysat unwirksam ist. Das Trypsin dürfte nach unseren Erfahrungen die Membran passiert haben und im Außenwasser zerstört worden sein.

Sehr viel größere Schwierigkeit bietet die Deutung der Ergebnisse von *Fricke* und seinen Mitarbeitern. Filtriert er Trypsinlösung durch eine 10%ige Membran, so ist im Ultrafiltrat keine proteolytische Wirkung feststellbar. Das ist nicht überraschend, denn es passiert nur Trypsin ohne Aktivator. Ungemein überraschend ist jedoch die Feststellung, daß unter Einwirkung einer elektrischen Spannung offenbar auch Kinase eine dichte Membran durchdringt. Auch unsere Beobachtung, daß bei neutraler und KOH-alkalischer Reaktion Kinase eine eiweißdichte Membran passiert, reicht für die Erklärung nicht aus, denn die proteolytische Wirkung wurde auf der anodischen Seite festgestellt, also auf der Seite, auf welcher sich Säure bildet. Auch die Berücksichtigung des *Bethe-Toropoffschen* Phänomens würde keine Erklärung bieten, denn danach ist alkalische Reaktion nur auf der Außenseite der Membran, während auf der Innenseite, wo das Ferment + Aktivator in die Membran eintritt, ebenfalls saure Reaktion herrscht. Eine gewisse qualitative Analogie bietet eine Beobachtung von *Bechhold* und *Rosenberg*². Bei der Elektro-Ultrafiltration von Gelatine fanden sie, daß in einem Potentialgefälle Gelatine durch ein Ultrafilter passierte, das sonst nur bei Unterdruck Gelatine durchließ. Quantitativ ist

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. 147, 286 ff.

² Diese Zeitschr. 157, 90, 1925.

allerdings der Unterschied gegenüber den Trypsinversuchen von *Fricke* erheblich. Wir befinden uns somit hier noch vor einem Problem, dessen Lösung vielleicht bedeutsam für das Fermentproblem im allgemeinen werden kann.

Zusammenfassende Darstellung unserer Ergebnisse.

Bei der *Ultrafiltration* von Trypsin (*Merck*)-Lösungen gelang es uns, *Trypsin von Enterokinase zu trennen*. Die Kinase wird bereits von einer 4%igen Eisessigkollodiummembran vollkommen zurückgehalten, während das Trypsin noch eine 10%ige Membran passiert. Durch *Vereinigung von Ultrafiltrat und Rückstand wird volle Reaktivierung* erzielt. Daraus müssen wir schließen, daß die *Kinaseteilchen* größer als die von Albumin und Hämoglobin sind und in ihren *Dimensionen etwa den Glutinteilchen entsprechen* dürften. *Trypsin* hingegen ist äußerst feindispers; es steht an der Grenze der Semikolloide, wenn es nicht gar kristalloid ist.

Durch Neutralisation mit *Kalilauge* oder bei schwacher Alkalität erfährt die Kinase eine *Dispersitätserhöhung*, so daß sie eine eiweißdichte Membran passiert. Diese Dispersitätserhöhung ist aber nicht nur bedingt durch die OH-Ionen, denn Alkalisierung mit Ammoniak hat nicht den gleichen Erfolg.

Bei der Zerlegung einer Trypsinlösung durch Ultrafiltration gehen die Salze, Eiweißabbauprodukte und dergleichen mit dem Trypsin durch das Ultrafilter. Die Kinase ist somit frei von Asche (0 % bzw. 0,3 %), Kohlehydraten und Proteinabbauprodukten; die höheren Proteine mit der Kinase bleiben im Filter zurück. Die Gewichtsmenge Kinase + Proteine beträgt 2,8 % des Rohtrypsins. Da sich noch ein Teil der Proteine abzentrifugieren läßt, so ist der gesamte Kinasegehalt im *Rohtrypsin weit weniger als 2,8 Gewichtsprozent des Rohtrypsins*.

Bei der Trennung von Kinase und Trypsin durch Ultrafiltration ist das Ultrafiltrat (das Trypsin) vollkommen inaktiv für Proteine, während bei der Kinase eine *Restaktivität von rund 16 % verbleibt*. Diese *Restaktivität kann weder durch erschöpfendes Auswaschen mit Wasser, noch mit n/20 Ammoniak, noch mit n/100 Salzsäure herabgedrückt werden*.

Während das *Trypsin in 2 1/2 Tagen vollkommen zerstört* wird, behält die Kinase ihre volle *Wirksamkeit mindestens 8 Tage lang* bei; auch die *Restaktivität*, also der (an die Kinase oder die bei ihr befindlichen Proteine) gebundene Teil des Trypsins, *verliert seine Aktivität in 8 Tagen nicht, ist geschützt*.

Die *Gegenwart von Proteinen hemmt die tryptische Wirkung*. Zusatz von Albumin verstärkt die Hemmung, Entfernung desselben hebt sie wieder auf (das Albumin konnte durch Ultrafiltration von Trypsin

getrennt werden). Diese tryptische Wirkung kann aber *durch Albumin nicht weiter herabgesetzt werden als bis etwa auf die Höhe der „Restaktivität“*, also bis auf rund 16 %. Auch die Restaktivität selbst läßt sich durch Albuminzusatz nicht weiter vermindern. Somit besteht *kein dynamisches Gleichgewicht zwischen Kinase und Trypsin, sondern ein Teil des Trypsins ist frei* und kann durch Ultrafiltration entfernt werden, ein anderer kleiner Bruchteil (rund 16 %) ist *fest verankert an die Kinase* und kann weder durch Ultrafiltration noch durch Albumin gelockert werden.

Es ist nicht leicht, sich eine Vorstellung darüber zu machen, welche Ursachen diesem eigenartigen Verhalten zugrunde liegen, denn man kann doch nicht gut zwei Arten Trypsin annehmen, von denen die eine sich fest, die andere locker bindet. *Folgende Analogie* aber könnte vielleicht als Leitgedanke für die Prüfung des Problems dienen: Aus Untersuchungen am „Institut für Kolloidforschung“ ergab sich, daß manche Schwermetallsalze mit Albumin Verbindungen eingehen, die sich äußerst leicht spalten und bei denen das Metallsalz auf dem Ultrafilter aus der Metallsalz-Albuminverbindung herausgewaschen werden kann, so daß auf dem Filter Albumin verbleibt, während das Metallsalz sich im Ultrafiltrat wiederfindet. Ist nun das Metallsalz, wie z. B. das Eisenchlorid, leicht hydrolysierbar und ist das Metallhydroxyd kolloid, so verbleibt auf dem Ultrafilter bei gleichmäßiger Arbeitsweise beim Auswaschen ein Albumin mit konstantem Metallhydroxydgehalt (Albumin-Eisenhydroxyd). Auf den vorliegenden Fall übertragen, würde das heißen: Der Kinase-Trypsinkomplex wird beim Auswaschen auf dem Ultrafilter gespalten; dabei geht ein Teil des Trypsins in eine gröber disperse Form über, die von der Kinase oder dem Protein adsorbiert wird. Wir brauchen kaum zu wiederholen, daß dies nur eine Arbeitshypothese ist.

Aber noch eine *zweite Erklärungsmöglichkeit* für die *Restaktivität* besteht: Wenn Protein die tryptische Wirkung des Kinase-Trypsinkomplexes hemmt, so heißt das, anders ausgedrückt: Die tryptisch wirksamen Gruppen werden von Protein adsorbiert. Wenn an der Kinase des Ultrafiltrerrückstandes rund 16 % Restaktivität verbleiben, die nicht entfernenbar sind, so heißt das: Dieser Anteil Trypsin ist so an den kolloiden Anteil (Kinase) verankert, daß die tryptischen Gruppen frei bleiben. Anders ausgedrückt: Man könnte sich vorstellen, daß das Trypsin zwei Arten adsorbierbarer chemischer Gruppen besitzt: ein Teil des Trypsins ist an seinen tryptischen Gruppen adsorbiert, denn Albumin und Trypsin lassen sich durch Ultrafiltration trennen; dieser Komplex ist sehr leicht spaltbar. Derjenige Anteil des Trypsins aber, welcher an seinen nichttryptischen Gruppen adsorbiert ist, ist sehr fest gebunden.

Schließlich konnten wir eine Entscheidung darüber treffen, ob die *Hemmung der tryptischen Wirkung* durch *Adsorption des Trypsins an Albumin* bedingt ist oder ob eine „*Blockierung*“ des Trypsins vorliegt. Wie schon oben dargelegt, tritt zwischen Albumin und Enzym keine feste Bindung ein, das Albumin hindert offenbar dadurch die tryptische Wirkung, daß es sich zwischen Kinase und Enzym schiebt.

Die Möglichkeit zur Durchführung dieser Untersuchung verdanken wir der Unterstützung der „*Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft*“, sowie der „*Liebig-Stipendienstiftung*“; beiden möchten wir unseren wärmsten Dank zum Ausdruck bringen. Auch Herrn Dr. *H. Karplus* danken wir für manchen guten Ratschlag, der zum Erfolg der Arbeit führte.

Der Fermentgehalt ruhender Weizensamen.

Von

A. Oparin und N. Pospelowa.

(Aus dem Karpow-Institut für Chemie, Moskau.)

(Eingegangen am 5. Juli 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Durch die Arbeiten einer Reihe von Autoren (1) ist seit langem festgestellt worden, daß die ruhenden Samen der verschiedensten Pflanzen eine gewisse, verhältnismäßig geringe Menge von Fermenten enthalten. Diese Fermentmengen sind überaus unbeständig, und die von verschiedenen Autoren für ein- und dieselbe Samensorte ermittelten Werte stimmen fast nie überein.

Es war von Interesse zu ermitteln, ob der Fermentgehalt der ruhenden Samen nur von der Pflanzenspezies und Sorte abhängt, oder ob auch anderweitige Faktoren hier mitspielen können.

Die von A. Bach, A. Oparin und R. Wähner (2) an reifenden Samen ausgeführten Bestimmungen haben erwiesen, daß der Gehalt der Samen an aktiven Fermenten nicht von vornherein seinen Endwert erreicht. Im Laufe der Reifung nimmt die Fermentmenge erst bedeutend zu, erreicht dann ein gewisses Maximum und fällt wieder ab, um bei der völligen Reife auf einem gewissen, für die ruhenden Samen kennzeichnenden Werte stehenzubleiben. Diese Erscheinung kommt dadurch zustande, daß sich bei der Samenreifung zwei in entgegengesetzter Richtung verlaufende Vorgänge kreuzen: die Neubildung der Fermente und deren Inaktivierung durch Verwandlung in Zymogene. Die Analysen geben nur von der Menge der aktiven Fermente eine Vorstellung, während die Zymogene sich der Bestimmung entziehen. Aus diesem Grunde stellen wir bei der Fermentbestimmung in ruhenden Samen lediglich fest, welche Fermentmenge zum Zeitpunkt der völligen Reife noch nicht zum Übergang in Zymogene gekommen ist. Es konnte a priori vermutet werden, daß dieser Wert in bedeutendem Maße von den äußeren Bedingungen abhängt, unter denen sich der Reifungsprozeß vollzogen hat.

Die nachstehenden Bestimmungen beweisen die Richtigkeit dieser Voraussetzung.

Es sind 26 verschiedene Sorten von Winterweizen reiner Linien aus den Ernten der Jahre 1925, 1924, 1923, 1922 und 1921 untersucht worden. Alle Samen haben wir aus der *Schatilowschen* landwirtschaftlichen Bezirksstation erhalten.

Tabelle I.

Kurze Charakteristik der untersuchten Weizensorten.

Nr. der Weizen-sorten	Botanische Merkmale	Varietät	Beginn der Ährenbildung 1926
03	Rote Ähre, Graune, rotkörnig	Trit. vulg. v. ferrugineum	16. VI.
051	Weißer " ohne Graune, rotkörnig	" " " lutescens	24. VI.
093	Rote " " " weißkörnig	" " " alborubrum	23. VI.
099	" " " " "	" " " "	24. VI.
0101	" " " " "	" " " "	23. VI.
0103	" " " " "	" " " "	23. VI.
0106	" " " " "	" " " "	23. VI.
0108	" " " " "	" " " "	23. VI.
0110	" " " " "	" " " "	23. VI.
0127	" " " " "	" " " "	24. VI.
0128	" " " " "	" " " "	24. VI.
0130	" " " " rotkörnig	" " " militurum	23. VI.
0140	" " " " weißkörnig	" " " alborubrum	23. VI.
0141	Weißer " Granne, rotkörnig	" " " erythrosperm.	23. VI.
0143	Rote " ohne Granne, weißkörnig	" " " alborubrum	24. VI.
0145	" " " " "	" " " "	24. VI.
0171	Weißer " Granne, rotkörnig	" " " erythrosperm.	23. VI.
0184	" " " " "	" " " graecum	21. VI.
0209	Rote " " " "	" " " ferrugineum	23. VI.
0274	Weißer " " " weißkörnig	" " " graecum	21. VI.
0338	Rote " " " rotkörnig	" " " ferrugineum	23. VI.
0410	Weißer " " " "	" " " erythrosperm.	19. VI.
0413	Rote " " " "	" " " ferrugineum	18. VI.
0424	Weißer " " " "	" " " erythrosperm.	22. VI.
0437	" " " " "	" " " "	23. VI.

Die Mehrzahl dieser Linien wurde aus den der Station gehörenden oder aus benachbarten Aussaaten von hiesigem Winterweizen herangezüchtet.

Gesät wurde am 16. bis 30. August, in den einzelnen Jahren an verschiedenen Tagen, in jedem Jahre aber für alle Linien zur gleichen Zeit. Durch den Zeitpunkt der Ährenbildung im Jahre 1926 werden die Sorten Nr. 03, 410, 413 als schnellreifend gekennzeichnet. Da dieses Merkmal sich gut vererbt, bleibt das Verhältnis zwischen den Linien in den verschiedenen Jahren das gleiche. Alle Sorten wurden unter den gleichen Bedingungen aufbewahrt; trotzdem haben einige Weizensorten ihre Keimfähigkeit vollständig eingebüßt, während bei anderen Sorten die Keimfähigkeit auf 50 bis 60% erhalten blieb.

Tabelle
Fermentgehalt der ruhenden Weizen

Nr.	Katalase						Peroxydase					
	1925	1924	1923	1922	1921	Arithm. Mittelw.	1925	1924	1923	1922	1921	Arithm. Mittelw.
03	94,5	98,0	62,0	91,0	79,0	84,9	172,5	155,0	92,0	84,0	94,5	119,6
051	109,4	115,9	—	105,9	73,5	101,2	135,6	137,6	—	67,5	64,7	101,3
093	103,5	111,5	120,0	117,5	99,5	110,4	245,0	141,5	268,5	200,5	207,5	212,6
099	76,0	111,2	75,2	—	85,5	86,9	116,6	147,6	156,5	—	144,0	141,2
0101	65,5	84,5	74,5	84,5	68,5	75,5	192,5	200,0	220,0	176,0	204,0	198,5
0103	69,2	103,0	88,0	77,3	72,0	81,9	171,5	208,2	211,7	137,3	172,5	180,2
0106	94,4	101,3	70,9	—	89,7	89,1	172,4	183,0	211,0	—	131,5	174,5
0108	56,5	87,1	84,5	81,0	76,5	77,1	170,0	234,5	185,0	143,0	137,5	174,0
0110	45,6	60,6	72,1	68,2	53,0	59,9	122,0	169,0	164,5	133,9	45,7	127,0
0127	60,5	80,0	64,0	50,5	59,0	62,8	181,0	202,0	150,0	127,5	151,5	162,5
0128	76,8	107,7	—	70,9	51,1	76,6	112,4	137,3	—	65,3	110,3	106,3
0130	83,5	90,5	66,1	75,5	54,3	74,0	186,5	188,5	210,0	180,5	156,0	184,3
0140	43,7	64,2	48,4	51,9	62,5	54,1	130,6	172,5	123,0	124,3	142,9	138,6
0141	85,4	103,8	105,9	—	117,0	103,0	206,7	211,4	210,3	—	218,4	211,4
0143	47,6	72,1	79,8	65,2	56,9	64,3	131,3	166,3	159,7	125,4	115,1	139,5
0145	48,0	66,6	58,0	58,5	53,1	56,8	142,1	185,6	154,1	90,7	93,5	133,6
0171	105,3	138,3	98,2	—	99,2	110,2	99,8	133,3	120,2	—	108,0	115,3
0184	69,7	85,1	95,8	78,4	71,2	80,0	139,1	167,4	132,4	92,7	96,5	125,6
0209	74,2	89,3	86,6	102,9	80,8	86,7	183,2	184,1	161,9	89,2	153,9	154,4
0274	124,2	125,2	—	108,5	88,9	111,7	221,2	239,9	—	187,6	224,9	223,4
0338	60,8	91,5	72,4	108,8	75,7	81,8	168,1	198,4	145,9	169,1	201,5	176,4
0410	89,5	72,9	77,6	58,8	52,7	70,3	169,4	178,1	152,6	192,0	182,7	174,4
0413	124,5	123,2	107,8	114,8	90,1	112,1	105,0	180,0	167,6	125,8	145,7	144,4
0424	93,1	108,1	—	96,2	97,0	98,6	184,6	219,6	—	198,8	203,6	201,6
0437	67,7	108,4	96,4	90,2	91,0	90,7	245,8	268,3	225,8	169,5	170,7	216,4
0287	107,7	115,4	—	101,9	66,8	97,2	210,7	224,6	—	209,0	226,6	217,3

Tabelle
Differenzen zwischen den arithmetischen Mittelwerten und den Versuchsergebnissen

Nr.	Katalase					Peroxydase				
	1925	1924	1923	1922	1921	1925	1924	1923	1922	1921
03	+ 9,6	+ 13,1	— 22,9	+ 6,1	— 5,9	+ 52,9	+ 35,4	— 27,6	— 35,6	— 25,3
051	+ 8,2	+ 14,7	—	+ 4,7	— 27,7	+ 34,3	+ 36,3	—	— 33,8	— 30,1
093	— 6,9	+ 1,1	+ 9,6	+ 7,1	— 10,9	+ 32,4	— 71,1	+ 55,9	— 12,1	— 1,4
099	— 10,9	+ 24,3	— 11,7	—	— 1,4	— 24,6	+ 6,4	+ 15,3	—	+ 1,4
0101	— 10,0	+ 9,0	— 1,0	+ 9,0	— 7,0	— 6,0	+ 1,5	+ 21,5	— 22,5	+ 1,4
0103	— 12,7	+ 21,1	+ 6,1	— 4,6	— 9,9	+ 8,7	+ 28,0	+ 31,5	— 42,9	— 1,4
0106	+ 5,3	+ 12,2	— 18,2	—	+ 0,6	— 2,1	+ 8,5	+ 36,5	—	— 4,4
0108	— 20,6	+ 10,0	+ 7,4	+ 3,9	— 0,6	— 4,0	+ 60,5	+ 11,0	— 31,0	— 3,4
0110	— 14,3	+ 0,7	+ 12,2	+ 8,3	— 6,9	— 5,0	+ 42,0	+ 37,5	+ 6,9	— 8,4

II.
samen in den verschiedenen Jahren.

Amylase						Von 50 Samen sind gekeimt					
1925	1924	1923	1922	1921	Arithm. Mittelw.	1925	1924	1923	1922	1921	Arithm. Mittelw.
14,8	18,5	16,1	18,4	20,0	17,6	34	50	47	33	14	35,6
30,2	29,5	—	23,7	28,6	28,0	37	25	—	17	0	19,8
34,2	26,8	43,0	39,0	45,8	37,7	47	49	28	37	18	35,8
39,8	44,5	71,3	—	39,8	48,8	42	48	28	—	22	35,0
30,0	35,2	40,7	28,2	38,1	34,4	47	50	39	45	42	44,6
13,8	28,6	34,8	21,0	—	24,5	32	49	38	39	46	40,8
30,3	39,9	51,7	—	41,4	40,8	33	48	24	—	19	31,0
13,8	17,2	16,0	—	26,9	18,5	30	49	42	47	37	41,0
—	—	—	—	—	—	49	49	28	41	9	35,2
33,7	22,1	31,8	18,8	25,1	26,3	40	48	27	42	44	40,2
32,4	36,5	—	30,4	34,6	33,5	25	50	—	32	12	29,8
25,1	28,5	24,4	6,2	5,9	18,0	50	50	27	32	13	34,4
31,6	34,6	50,2	29,3	29,4	35,0	16	49	32	19	40	31,2
—	—	—	—	—	—	32	43	5	—	18	24,5
34,2	39,2	44,2	24,5	36,1	35,6	11	49	30	35	29	30,8
29,9	28,4	41,0	26,0	32,0	31,4	9	48	28	38	10	26,6
—	—	—	—	—	—	47	47	5	—	11	27,5
—	—	—	—	—	—	35	50	32	11	0	25,6
31,7	31,9	33,0	15,8	27,3	27,9	42	48	7	32	0	25,8
52,5	36,4	—	22,2	34,0	36,3	30	48	—	21	0	24,8
24,5	27,4	30,0	18,3	25,6	25,2	31	50	0	18	0	19,8
78,3	56,6	70,6	47,4	46,7	59,9	48	45	13	0	0	21,2
29,7	31,9	16,9	23,6	25,9	25,6	39	50	16	30	0	27,0
—	—	—	—	—	—	37	50	—	38	42	41,8
34,0	34,0	36,6	26,1	47,4	35,6	15	50	20	26	0	22,2
38,0	32,4	—	22,0	39,0	32,8	31	49	—	27	0	26,8

III.
entsprechend der jährlichen Abweichung vom Mittelwert der verschiedenen Sorten.

Amylase					Von 50 Samen sind gekeimt				
1925	1924	1923	1922	1921	1925	1924	1923	1922	1921
— 2,8	+ 0,9	— 1,5	+ 0,8	+ 2,4	— 1,6	+ 14,4	+ 11,4	— 2,6	— 21,6
+ 2,2	+ 1,5	—	— 4,3	+ 0,6	+ 17,2	+ 5,2	—	— 2,8	— 19,8
— 3,5	— 10,9	+ 5,3	+ 1,3	+ 8,1	+ 11,2	+ 13,2	— 7,8	+ 1,2	— 17,8
— 9,0	— 4,3	+ 22,5	—	— 9,0	+ 7,0	+ 13,0	— 7,0	—	— 13,0
— 4,4	+ 0,8	+ 6,3	— 6,2	+ 3,7	+ 2,4	+ 5,4	— 5,6	+ 0,4	— 2,6
— 10,7	+ 4,1	+ 10,3	— 3,5	—	— 8,8	+ 8,2	— 2,8	— 1,8	+ 5,2
— 10,5	— 0,9	+ 10,9	—	+ 0,6	+ 2,0	+ 17,0	— 7,0	—	— 12,0
— 4,7	— 1,3	— 2,5	—	+ 8,4	— 11,0	+ 8,0	+ 1,0	+ 6,0	— 4,0
—	—	—	—	—	+ 13,8	+ 13,8	— 7,2	+ 5,8	— 26,2

Tabelle II

Nr.	Katalase					Peroxydase				
	1925	1924	1923	1922	1921	1925	1924	1923	1922	1921
0127	- 2,3	+ 17,2	+ 1,2	- 12,3	- 3,9	+ 18,5	+ 39,5	- 12,5	- 35,0	- 11,0
0128	+ 0,2	+ 31,1	—	- 5,7	- 25,5	+ 6,1	+ 31,0	—	- 41,0	- 4,0
0130	+ 9,5	+ 16,5	- 7,9	+ 1,5	- 19,7	+ 2,2	+ 4,2	+ 25,7	- 3,8	- 28,5
0140	- 10,4	+ 10,1	- 5,7	- 2,2	+ 8,4	- 8,0	+ 33,9	- 15,6	- 14,3	+ 4,3
0141	- 17,6	+ 0,8	+ 2,9	—	+ 14,0	- 4,7	± 0	- 1,1	—	+ 6,0
0143	- 16,7	+ 7,8	+ 15,5	+ 0,9	- 7,4	- 8,2	+ 21,8	+ 20,2	- 14,1	- 24,4
0145	- 8,8	+ 9,8	+ 1,2	+ 1,7	- 3,7	+ 9,1	+ 52,6	+ 21,1	- 43,7	- 40,5
0171	- 4,9	+ 28,1	- 12,0	—	- 11,0	- 15,5	+ 18,0	+ 4,9	—	- 7,3
0184	- 10,3	+ 5,1	+ 15,8	- 1,6	- 8,8	+ 13,5	+ 41,8	+ 6,8	- 32,9	- 29,1
0209	- 12,5	+ 2,6	- 0,1	+ 16,2	- 5,9	+ 28,8	+ 29,7	+ 7,5	- 65,2	- 0,5
0274	+ 12,5	+ 13,5	—	- 3,2	- 22,8	- 2,2	+ 16,5	—	- 35,8	+ 1,5
0338	- 21,0	+ 9,7	- 9,4	+ 27,0	- 6,1	- 8,5	+ 21,8	- 30,7	- 7,5	+ 24,9
0410	+ 19,2	+ 2,6	+ 7,3	- 11,5	- 17,6	- 5,5	+ 3,2	- 22,3	+ 17,1	+ 7,8
0413	+ 12,4	+ 11,1	- 4,3	+ 2,7	- 22,0	- 39,8	+ 35,2	+ 22,8	- 19,0	+ 0,9
0424	- 5,5	+ 9,5	—	- 2,4	- 1,6	- 17,0	+ 18,0	—	- 2,8	+ 1,7
0437	- 23,0	+ 17,7	+ 5,7	- 0,5	+ 0,3	+ 29,8	+ 52,3	+ 9,8	- 46,5	- 45,3
0287	+ 7,5	+ 18,2	—	+ 4,7	- 30,4	- 7,0	+ 6,9	—	- 8,7	+ 8,9

In jeder Samenprobe wurde der Gehalt an Katalasen, Peroxydase und Amylase nach dem von *A. Bach* und *A. Oparin* (3) beschriebenen Verfahren bestimmt. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle II zusammengestellt.

Aus den angegebenen Zahlen ist ersichtlich, daß verschiedene Sorten sehr verschiedene Fermentmengen enthalten. Aber auch binnen ein und derselben reinen Linie schwanken diese Mengen erheblich. Diese Schwankungen können nur von den äußeren Bedingungen (Temperatur und atmosphärische Verhältnisse, Boden, Düngung usw.) abhängen, unter denen die Reifung der Samen stattgefunden hat. Um den Charakter dieser Schwankungen zu ermitteln und den Ursachen derselben näher zu treten, haben wir in jedem einzelnen Falle die Differenz zwischen dem arithmetischen Mittelwert der entsprechenden Sorte (Schrägdruck, Tabelle II) und der Fermentmenge berechnet, die in den Samen der Ernte des einen oder des anderen Jahres gefunden wurde.

Die angeführten Differenzen kennzeichnen die Abweichungen der Fermentmengen von den Mittelwerten der entsprechenden Sorten. Beim Studium der Tabelle tritt deutlich die Abhängigkeit dieser Abweichungen von dem Erntejahr hervor (das heißt, vom Zeitpunkt der Aussaat und den Witterungsverhältnissen). So z. B. lag der Katalasegehalt aller Sorten im Jahre 1924 über dem Mittelwert. Dagegen war im Jahre 1921 die Katalasemenge in allen Sorten geringer

(Fortsetzung).

Amylase					Von 50 Samen sind gekeimt				
1925	1924	1923	1922	1921	1925	1924	1923	1922	1921
+ 7,4	— 4,2	+ 5,5	— 7,5	— 1,2	— 0,2	+ 7,8	— 13,2	+ 1,8	+ 3,8
— 1,1	+ 3,0	—	— 3,1	+ 1,1	— 4,8	+ 20,2	—	+ 2,2	— 17,8
+ 7,1	+ 10,5	+ 6,4	— 11,8	— 12,1	+ 15,6	+ 15,6	— 7,4	— 2,4	— 21,4
— 3,4	— 0,4	+ 15,2	— 5,7	— 5,6	— 15,2	+ 17,8	+ 0,8	— 12,2	+ 8,8
—	—	—	—	—	+ 7,5	+ 18,5	— 19,5	—	— 6,5
— 1,4	+ 3,4	+ 8,6	— 11,1	+ 0,5	— 19,8	+ 18,2	— 0,8	+ 4,2	— 1,8
— 1,5	— 3,0	+ 9,6	— 5,4	+ 0,6	+ 17,0	+ 21,4	+ 1,4	+ 11,4	— 16,6
—	—	—	—	—	+ 19,5	+ 19,5	— 22,5	—	— 16,5
—	—	—	—	—	+ 9,4	+ 24,4	+ 6,4	— 14,6	— 25,6
+ 3,0	+ 4,0	+ 5,1	— 12,1	— 0,6	+ 16,2	+ 22,2	— 18,8	+ 6,2	— 25,8
+ 16,2	+ 0,1	—	— 14,1	— 2,3	+ 5,2	+ 23,2	—	— 3,8	— 24,8
— 0,7	+ 2,2	+ 5,1	— 6,9	+ 0,4	+ 11,2	+ 30,2	— 19,8	— 1,8	— 19,8
+ 18,4	— 3,3	+ 10,7	— 12,5	— 13,2	+ 26,8	+ 23,8	— 8,2	— 21,2	— 21,2
+ 4,1	+ 6,3	— 8,7	— 2,0	+ 0,3	+ 12,0	+ 23,0	— 11,0	+ 3,0	— 27,0
—	—	—	—	—	— 4,8	+ 8,2	—	— 3,8	+ 0,2
— 1,6	— 1,6	+ 1,0	— 9,5	+ 11,8	— 7,2	+ 27,8	— 2,2	+ 3,8	— 22,2
+ 5,2	— 0,4	—	— 10,8	+ 6,2	+ 4,2	+ 22,2	—	+ 0,2	— 26,8

als der mittlere Gehalt. Im Jahre 1922 ergeben Peroxydase und Amylase fast durchweg Minderwerte, während das Jahr 1923 zahlreiche Mehrwerte aufweist.

Es wirken auch andere äußere Faktoren mit (Bodenbeschaffenheit, Menge der Düngstoffe usw.), die aber bei unseren Untersuchungsbedingungen nicht gemessen werden konnten. Ihre Wirkung gibt sich daher in der Form zufälliger Abweichungen kund, die zu den durch das Erntejahr bedingten Grundschwankungen hinzutreten. Um die letzteren in mehr oder weniger reiner Form zum Ausdruck zu bringen, haben wir auch die algebraischen Mittelwerte jedes einzelnen Jahres für alle Sorten berechnet.

Betrachten wir diese mittleren jährlichen Schwankungen der einzelnen Fermente, so können wir wahrnehmen, daß zwischen den Änderungen des Peroxydase- und Amylasegehalts ein ziemlich vollständiger Parallelismus besteht. In dem Verhältnis zwischen Peroxydase und Katalase tritt vielmehr die umgekehrte Beziehung hervor. Es ist interessant, diesen Umstand mit den Beobachtungen zu vergleichen, die von *A. Bach*, *A. Oparin* und *R. Wähner* in der oben zitierten Arbeit mitgeteilt wurden. Beim Reifen der Samen entspricht dem Anstieg der Peroxydasekurve stets eine Senkung der Katalasekurve. Folglich wirken die Bedingungen, die die Bildung aktiver Peroxydase begünstigen, auf die Entstehung aktiver Katalase in entgegengesetzter Richtung und vice versa.

Tabelle IV.

Algebraische Mittelwerte der Abweichungen von der Norm für alle Sorten in jedem Jahre.

Erntejahr	Katalase	Peroxydase	Amylase	Keimfähigkeit
1925	— 4,8	+ 3,2	+ 0,4	+ 4,8
1924	+ 12,2	+ 22,3	+ 10,7	+ 17,0
1923	+ 0,1	+ 10,4	+ 6,4	— 6,7
1922	+ 2,3	— 23,8	— 6,9	— 0,9
1921	— 9,0	— 13,6	± 0	— 14,3

Von Interesse ist ferner, die Beziehung zwischen dem Fermentgehalt und der Keimfähigkeit der untersuchten Samen zu verfolgen.

Hier muß vor allem hervorgehoben werden, daß auch diejenigen Samen, die ihre Keimfähigkeit vollständig eingebüßt haben, noch einen gewissen Gehalt an Fermenten aufweisen.

Diese Tatsache stimmt vollkommen mit den Angaben von *Bronski*, *White*, *Brocq-Roussen* und *Gain* (4) überein, die in verschiedenen Sorten ruhender Samen die Amylase und die Protease bestimmt haben. *Nemec* und *Duchon* (5) bestimmten die Katalase in Erbsen und Hafersamen verschiedener Erntejahre. Sie stellten völligen Parallelismus zwischen Katalasegehalt und Keimfähigkeit der Samen fest. *J. de Wilmarin* und *Cazoubon* (6), die mit mehreren Erbsenvarietäten arbeiteten, bestätigten die Angaben von *Nemec* und *Duchon*; bei der Fichte und der Lärche konnte aber kein Zusammenhang zwischen dem Katalasegehalt und der Keimfähigkeit nachgewiesen werden. Hier blieb sogar nach dem völligen Absterben der Samen die Katalase in erheblicher Menge erhalten. *Neljubow* (7) wiederholte die

Versuche von *Nemec* und *Duchon* an Erbsen und Hafer und konnte auch in diesem Falle keinen Zusammenhang zwischen der Katalasemenge und dem Prozentgehalt der Probe an keimfähigen Samen beobachten.

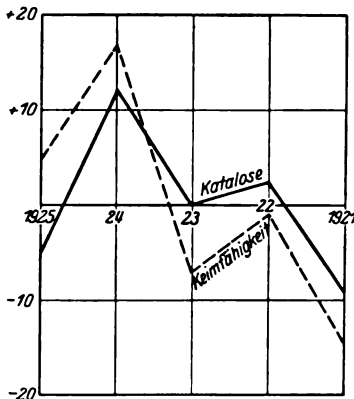


Abb. 1.

Betrachten wir unsere Ergebnisse für die verschiedenen Weizensorten in den verschiedenen Jahren, so finden wir keine Übereinstimmung zwischen dem Katalasegehalt und der Keimfähigkeit. Das gegenseitige Verhältnis der algebraischen Mittelwerte (s. Tab. IV) der Katalase und der Keimfähigkeit in den verschiedenen Jahren zeigt dagegen einen ziemlich weitgehenden Parallelismus.

Folglich kann eine gesetzmäßige Abhängigkeit zwischen Keimfähigkeit und Katalasegehalt aufgestellt werden, wenn mit verschiedenen Weizensorten gearbeitet wird; im Rahmen einer einzelnen Sorte besteht aber eine solche Gesetzmäßigkeit. Allem Anschein nach verringern

diejenigen äußeren Faktoren, die den Gehalt der Samen an aktiver Katalase herabsetzen, auch die Keimfähigkeit der Samen.

Schlußfolgerungen.

1. Der Fermentgehalt ruhender Samen hängt nicht bloß von der Sorte der Samen ab, sondern auch von dem Erntejahr.
2. Samen, die ihre Keimfähigkeit verloren haben, enthalten noch eine gewisse Menge Katalase, Peroxydase und Amylase.
3. Die Jahresschwankungen des Katalasegehalts gehen mit den Schwankungen der Keimfähigkeit der Samen parallel.

Literatur.

1) Zusammenfassung der Arbeiten über diese Frage s. *F. Czapek*, Biochem. d. Pflanzen 1, 427, 2, 249, 3, 142, 1913 bis 1921; *C. Oppenheimer*, Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl., S. 408, 501, 706, 887, 1113, 1773, 1858. — 2) *A. Bach, A. Oparin, R. Wähner*, Arb. d. Karpow-Inst. f. Chem. 1926; diese Zeitschr. 180, 363, 1927. — 3) *A. Bach, A. Oparin*, diese Zeitschr. 184, 183, 1922. — 4) *Bronski*, Ann. of Botan. 22, 449, 1908; *J. White*, Proc. Roy. Soc. 81, 417, 1909; *Brocq-Roussen und Gain*, C. r. 148, 359, 1908. — 5) *Nemec und Duchon*, ebendasselbst 174, 632, 1921. — 6) *J. de Wilmarin und Cazaubon*, ebendasselbst 175, 50 bis 51, 1922. — 7) *D. Neljubow*, Ann. f. Samenkd. d. St. Botan. Gart. 4, H. 7, 1925.

Über die Anwendung von Mischindikatoren in der Acidimetrie und Alkalimetrie.

Von

J. M. Kolthoff.

(Aus dem pharmazeutischen Laboratorium der Reichsuniversität Utrecht.)

(Eingegangen am 18. Juli 1927.)

1. Die gebräuchlichen Indikatoren in der Neutralisationsanalyse haben bekanntlich nicht einen Umschlagspunkt, wo sie plötzlich ihre Farbe von der rein sauren in die der rein alkalischen Form ändern, sondern sie haben — im p_H ausgedrückt — ein bestimmtes Umwandlungsintervall, in dem sie allmählich umschlagen. Bei vielen Titrationsen ist der Sprung im p_H beim Äquivalenzpunkt so groß, daß das Umwandlungsintervall der geeigneten Indikatoren dort mit einem Tropfen Reagens durchlaufen wird. Die Farbe ändert sich dann plötzlich von der rein sauren nach der rein alkalischen Form oder umgekehrt.

In den Fällen jedoch, wo der p_H -Verlauf beim Äquivalenzpunkt nur vag ist, gibt kein Indikator mehr einen scharfen Umschlag. Man muß dann eine Vergleichslösung anwenden, welche ein p_H hat, das dem Wert beim Äquivalenzpunkt entspricht; man titriert dann bis zu einem bestimmten Titrierexponenten p_T . Hätte man nun die Verfügung über eine Reihe Indikatoren, welche ihre Farbe plötzlich bei einem bestimmten p_H scharf ändern, so könnte man im letzterwähnten Falle auch ohne Vergleichslösung auskommen.

Durch eine Kombination von zwei geeigneten Farbstoffen gelingt es nun sehr oft, Gemische herzustellen, welche bei einem bestimmten p_H ihre Farbe ziemlich scharf ändern. Man kann dabei in folgender Weise verfahren: a) Man fügt zu dem Indikator einen Farbstoff, der eine komplementäre Farbe von einer der beiden Indikatorfarben hat. So hat Methylgrün fast die komplementäre Farbe der rotvioletten alkalischen Form des Phenolphthaleins. Nimmt man nun ein Gemisch von etwa 1% Phenolphthalein und 0,2% Methylgrün, so ist der Misch-

indikator in saurer Lösung grün gefärbt. Beim p_H von 8,4 fängt das Phenolphthalein umzuschlagen an, die Farbe wird dann grau; beim p_H 8,8 fahlblau. Hier kompensieren beide Farben einander praktisch vollkommen. Wird die Reaktion noch stärker alkalisch, so überwiegt plötzlich die rotviolette Form des Phenolphthaleins, und beim p_H von 9,0 wird die Farbe schön violett. Das Phenolphthalein-Methylgrün-gemisch ist also ein vorzüglicher Indikator für eine Titration auf ein p_T von 9,0. b) Man wählt Indikatorgemische, und zwar solche, deren Komponente ungefähr bei dem gleichen p_H ihre Indikatorwirkung ausüben und dort mehr oder weniger Kontrastfarben bilden. Kennt man die Extinktions- oder Transmissionskoeffizienten der verschiedenen Indikatoren bei verschiedenen Wellenlängen und p_H -Werten, so kann man daraus schon geeignete Kombinationen ableiten. *A. Cohen*¹ hat z. B. eine Mischung von gleichen Teilen Bromkresolpurpur und Bromthymolblau empfohlen. Dieser Indikator ist bei p_H 6,0 grüngelb, bei p_H 6,8 rein blau; der Umschlag ist scharf.

Schon *M. Scholtz*² hat eine größere Reihe Mischindikatoren angegeben, welche wenig angewendet werden. Bekannt ist das Methylorange-Indigocarmingemisch, das auch *Luther*³ und *Kirschnik*⁴ empfohlen haben. Bei einem p_H größer als 4,0 ist die Farbe grün, bei 4,0 grau, und bei kleinerem p_H wird sie violett. Besonders bei künstlichem Lichte ist der Umschlag scharf zu sehen.

2. Weil die Mischindikatoren, wie gesagt, von großem praktischen Interesse sind in den Fällen, wo man bis zu einem bestimmten p_H titrieren muß, habe ich eine größere Reihe Kombinationen systematisch untersucht und gebe in untenstehender Tabelle im p_H -Gebiet von 3 bis 11 diejenigen an, welche sich gut bewährt haben. Die erste Reihe gibt die Zusammensetzung des Gemisches. Im allgemeinen ist es zu empfehlen, die Mischindikatoren in braunen Flaschen aufzubewahren, weil verschiedene Farbstoffe sich am Lichte zersetzen.

In der zweiten Kolonne sind die p_T -Werte erwähnt, d. h. das p_H , wo der Indikator umschlägt, in der dritten Reihe ist die saure und alkalische Farbe angegeben, und in der letzten Kolonne sind einige Einzelheiten mitgeteilt.

¹ *A. Cohen*, Journ. Amer. Chem. Soc. **44**, 185, 1922; vgl. auch *Lizius*, Analyst **46**, 355, 1921; *F. H. Carr*, ebendasselbst **47**, 196, 1922; *G. Chabot*, Chem. Zentralbl. **96**, 1375, 1922; *G. Simpson*, Ind. Engin. Chem. **16**, 709, 1924.

² *M. Scholtz*, Zeitschr. f. Elektrochem. **10**, 549, 1904.

³ *Luther*, Chem.-Ztg. **31**, 1172, 1904.

⁴ *Kirschnik*, ebendasselbst **31**, 960, 1907; *F. X. Moerk*, Amer. Journ. Pharm. **98**, 675, 1921; *Hickman* und *Lindstead*, Journ. Chem. Soc. **121**, 2502, 1922.

Tabelle. Umwandlungspunkte geeigneter Mischindikatoren.

Zusammensetzung der Indikatorlösung	p_T	Saure Farbe	Alkalische Farbe	Bemerkungen
1 Teil Dimethylgelb 0,1 % in Alkohol	3,25	blauviolett	grün	Beim $p_H = 3,4$ noch grün, bei 3,2 blauviolett; ausgezeichnete Indikator.
1 " Methylenblau 0,1 % " in dunkler Flasche aufbewahren				
1 Teil Methylorange 0,1 % in Wasser	4,1	violett	"	Guter Indikator, besonders bei künstlicher Beleuchtung.
1 " Indigocarmin 0,25 % " in dunkler Flasche aufbewahren				
1 Teil Hexamethoxytriphenylcarbinol 0,1 % in Alkohol	4,0	"	"	Bei $p_H = 4,0$ ist die Farbe blauviolett.
1 " Methylgrün 0,1 %				
1 Teil Methylorange 0,1 % in Wasser	4,3	"	"	Sehr scharfe Farbänderung. Ausgezeichnete Indikator.
1 " Anilinblau 0,1 % in Wasser				
3 Teile Bromkresolblau 0,1 % in Alkohol	5,1	weinrot	"	
1 Teil Methylrot 0,2 % in Alkohol				
1 Teil Methylrot 0,2 % in Alkohol	5,4	rotviolett	"	Beim $p_H = 5,4$ ist die Farbe schmutzig blau, bei $p_H = 5,6$ schmutzig grün, b. 5,2 rotviolett.
1 " Methylenblau 0,1 % in Alkohol in dunkler Flasche aufbewahren				
1 Teil Bromkresolblau Na 0,1 % in Wasser	5,6	violett	gelbgrün	Bei $p_H = 5,6$ rotbraun, sehr guter Indikator.
1 " Alizarinaulfosaures Na 0,1 % in Wasser				
1 Teil Chlorphenolrot Na 0,1 % in Wasser	5,8	grün	violett	Bei $p_H = 5,8$ schwach violett.
1 " Anilinblau 0,1 % in Wasser				
1 Teil Bromkresolblau Na 0,1 % in Wasser	6,1	gelbgrün	blauviolett	Bei $p_H = 5,4$ blaugrün, bei 5,8 blau mit Stich ins Violett, bei 6,2 blauviolett.
1 " Chlorphenolrot Na 0,1 % " in Wasser				
1 Teil Bromkresolpurpur Na 0,1 % in Wasser	6,7	gelb	violettblau	Bei $p_H = 6,2$ gelbviolett, bei 6,6 violett, bei 6,8 blauviolett.
1 " Bromthymolblau Na 0,1 % in Wasser				
2 Teile Bromthymolblau Na 0,1 % in Wasser	6,9	violett	blau	
1 Teil Azolithmin 0,1 % in Wasser				
1 Teil Neutralrot 0,1 % in Alkohol	7,0	violettblau	grün	Bei $p_H = 7,0$ violettblau, ausgezeichnete Indikator.
1 " Methylenblau 0,1 % in Alkohol in dunkler Flasche aufbewahren				

Tabelle (Fortsetzung.)

Zusammensetzung der Indikatorlösung	p _H	Saure Farbe	Alkalische Farbe	Bemerkungen
1 Teil Neutralrot 0,1 % in Alkohol	7,2	rosa	grün	Beim p _H = 7 schmutzig grün, bei 7,2 schwach rosa, 7,0 deutlich rosa.
1 " Bromthymolblau 0,1 % in Alkohol				
2 Teile Cyanin 0,1 % in 50%igem Alkohol	7,3	gelb	violett	Beim p _H = 7,2 orange, bei 7,4 schön violett, Farbe schwächt beim Stehen ab.
1 Teil Phenolrot 0,1 % in 50%igem Alkohol				
Zersetzt sich beim Aufbewahren.				
1 Teil Bromthymolblau Na 0,1 % in Wasser	7,5	"	"	Bei p _H = 7,2 schmutzig grün, bei 7,4 schwach violett, bei 7,6 stark violett, ausgez. Indikator.
1 " Phenolrot Na 0,1 % in Wasser				
3 Teile Thymolblau Na 0,1 % in Wasser	8,3	"	"	Bei p _H = 8,2 rosa, bei 8,4 deutlich violett, ausgez. Indikator.
2 Teile α-Naphtholphthalein 0,1 % in Alkohol				
1 Teil Kresolrot 0,1 % in Alkohol	8,3	schwach rosa	"	Bei p _H = 8,2 schwach violett, bei 8,4 stark violett.
1 Teil α-Naphtholphthalein 0,1 % in Alkohol				
3 Teile Phenolphthalein 0,1 % in Alkohol	8,9	"	"	Bei p _H = 8,6 schwach grün, bei 9,0 deutlich violett.
1 Teil Phenolphthalein 0,1 % in Alkohol				
2 Teile Methylgrün 0,1 % in Alkohol	8,9	grün	"	Bei p _H = 8,8 fahlblau, bei 9,0 violett.
1 Teil Thymolblau 0,1 % in 50%igem Alkohol				
3 Teile Phenolphthalein 0,1 % in 50%igem Alkohol	9,0	gelb	"	Farbe von Gelb über Grün nach Violett, ausgezeichn. Indikator.
2 Teile Phenolphthalein 0,1 % in 50%igem Alkohol				
1 Teil Naphtholphthalein 0,1 % in 50%igem Alkohol	9,6	schwach rosa	"	Farbe über Grün nach Violett, ausgezeichneter Indikator.
1 Teil Phenolphthalein 0,1 % in Alkohol				
1 " Thymolphthalein 0,1 % in Alkohol	9,9	farblos	"	Bei p _H = 9,6 rosa, bei 10,0 violett scharf zu sehen.
1 Teil Phenolphthalein 0,1 % in Alkohol				
2 Teile Nilblau 0,2 % in Alkohol	10,0	blau	rot	Bei p _H = 10,0 violett, ausgezeichneter Indikator.
2 Teile Thymolphthalein 0,1 % in Alkohol				
1 " Alizarin gelb 0,1 % in Alkohol	10,2	gelb	violett	Scharf zu sehen.
2 Teile Nilblau 0,1 % in Wasser				
1 Teil Alizarin gelb 0,1 % in Wasser	10,8	grün	rotbraun	
1 Teil Alizarin gelb 0,1 % in Wasser				

Unter den genannten Farbstoffen sind zwei Indikatoren, nämlich Cyanin- und Nilblau (*Grübler*), welche in den Büchern über Farb-indikatoren nicht beschrieben sind.

*Cyanin*¹ oder *Chinolinblau*, $C_{19}H_{35}N_2J$. Ein Präparat von Dr. G. *Grübler* wurde verwendet. Beim Herstellen der Vorratlösung wurden 100 mg in 30 ccm Alkohol gelöst und mit Wasser auf 100 ccm angefüllt. In saurem Medium ist der Indikator farblos, zwischen p_H 6,6 und 8,6 schlägt er nach Blau um. Beim p_H 7,0 ist er schwach blau, bei 7,4 deutlich blau. Ein Nachteil ist, daß die blaue Farbe nicht haltbar ist; es findet eine Umwandlung in eine farblose Form statt, so daß schon nach 15 Minuten langem Stehen die Farbtiefe merkbar abgenommen hat. Der Indikator hat auch die Neigung, an der Glaswand adsorbiert zu werden; mit Säure können die Röhren leicht gereinigt werden. In stark alkalischer Lösung wird die blaue Farbe violett. Das Cyanin verhält sich wie eine schwache Base mit einer Konstante von etwa $4 \cdot 10^{-7}$. Als Indikator für die p_H -Messung hat das Cyanin wegen des starken Ablassens der Farbe mit der Zeit kaum eine Bedeutung. Bei Neutralisationsanalysen spielt dieser Zeitfaktor fast keine Rolle, besonders dann nicht, wenn man von sauer nach alkalisch titriert. Ein großer praktischer Nachteil ist, daß die Indikatorlösung an sich beim Stehen auch verdirbt.

Nilblau (basischer Indikator), Präparat *Grübler*. Vorratlösung 0,2 % in Wasser. Umwandlungsintervall von 9,6 nach 10,6, von Blau nach Rosarot. Der Umschlag ist sehr scharf zu sehen; beim p_H 9,6 ist die Farbe blau, bei 9,8 schon deutlich violettrot. Der Indikator ist sehr gut brauchbar für p_H -Messungen und Titrationen. Phosphorsäure läßt sich darauf als zweibasische Säure scharf titrieren, man fügt so lange Lauge hinzu, bis die Farbe sich von Blau in Rotviolett ändert. Die rote alkalische Form des Indikators ist in Wasser schwer löslich; er ist in Wasser kolloid gelöst. Vom Nilblau kann man auch ein sehr brauchbares Indikatorpapier aus der 0,2 %igen, wässrigen Lösung herstellen. Mit einem Tropfen 0,002 n Natronlauge bildet es sofort noch einen roten Kreis, mit 0,0005 n NaOH einen roten Ring, Empfindlichkeitsgrenze 0,00025 n NaOH. In Puffermischungen geht die Empfindlichkeit bis zum p_H 9,6.

In stark saurer Lösung wird das Nilblau gelb gefärbt, in $n/10$ HCl ist die Farbe blau, in 0,5 n HCl grün, in 2 n HCl rein gelb. Das Indikatorpapier ist noch weniger empfindlich für Säure, mit einem Tropfen 2 n HCl ist die Farbe grün, mit 4 n HCl gelb.

¹ E. B. R. *Prideaux* erwähnt in seinem Buche: „The theory and use of Indicators“ schon das Cyanin. Von p_H 0 bis 6 ist es farblos, bei 7 schwach blau, bei 8 blau, bei 9 violettblau; also eine gute Übereinstimmung mit meinen Wahrnehmungen.

3. Bei der Titration von mäßig starken Säuren neben sehr schwachen Säuren, von schwachen Säuren mit schwachen Basen, von sehr schwachen Säuren mit starken Basen und umgekehrt, bei der Anwendung von Verdrängungstitrationen können die Mischindikatoren von großem Vorteil sein. Es seien hier nur einige Beispiele zur Erläuterung angeführt.

Titration von n/10 Pyridin mit Salzsäure. Das p_T beträgt hier ungefähr 3,3. Führt man die Titration auf Dimethylgelb bzw. Methylorange bzw. Bromphenolblau aus, so wird die erste Farbänderung viel zu früh wahrgenommen. Mit dem Mischindikator Dimethylgelb-Methylenblau tritt der Farbumschlag von Grün nach Violett genau beim Äquivalenzpunkt auf. Genauigkeit etwa 0,5 %.

Hat man Ammoniak neben Pyridin zu bestimmen und sind beide in äquivalenter Menge vorhanden, so nimmt man einen Mischindikator, der beim p_T 7,4 umschlägt. Die Summe beider Basen kann dann in einer besonderen Probe auf Dimethylgelb-Methylenblau festgestellt werden.

Der Mischindikator α -Naphtholphthalein-Phenolphthalein ($p_T=9,5$) ist sehr geeignet für die Phosphorsäuretitration. Veronal, das eine sehr schwache Säure ist, läßt sich auf Phenolphthalein nicht titrieren, der Umschlag erscheint viel zu früh. Brauchbare Resultate erhält man mit dem Mischindikator Thymolphthalein-Alizarin gelb ($p_T = 10,20$). Man titriert mit n/10 Natronlauge so lange, bis die gelbe Farbe sich deutlich in Grünblau mit einem Stich ins Violette geändert hat. Genauigkeit 1 %.

Den Mischindikator Kresolrot-Thymolblau ($p_T = 8,3$) hat Simpson (l. c.) schon verwendet für die Titration von Carbonat zu Bicarbonat. Der Umschlag ist sehr deutlich zu sehen.

Für die Neutralisation von Essigsäure bis zu Ammoniumacetat hat man einen Mischindikator mit einem p_T von 7,0 bis 7,2 zu verwenden.

In allen Fällen, wo man das p_H beim Äquivalenzpunkt weiß, kann man sich den geeigneten Mischindikator aussuchen.

Für die schnelle Orientierung der Reaktion einer Flüssigkeit sind die Mischindikatoren auch geeignet. Will man z. B. sehen, ob ein Wasser ein p_H kleiner oder größer als 7 hat, so fügt man den Mischindikator Neutralrot-Methylenblau hinzu. Beim p_H 6,8 ist die Farbe schön violett, bei 7,0 violettblau, bei 7,2 schmutzig grünblau, bei 7,4 rein grün.

4. Ich habe von verschiedenen Mischindikatoren auch Papiere hergestellt; wegen der oft auftretenden Kapillarerscheinungen sind nur wenige brauchbar. Besonders geeignet ist α -Naphtholphthalein-Phenolphthaleinpapier.

Gehärtetes Filtrierpapier wird mit einem Gemisch von 0,3 %iger Phenolphthalein- und 0,1 %iger Naphtholphthaleinlösung in 70 %igem Alkohol durchtränkt und trocknen gelassen. Das Papier ist schwach

rosa. Beim Betupfen mit Puffermischungen wird es beim p_H 9,2 schwach grün, beim p_H 9,4 entsteht ein rosa Kreis mit einem grünen Ring, beim p_H 9,6 wird das Papier deutlich violett mit einer grünen Zone, bei 9,8 wird es tief rotviolett gefärbt; durch die Kapillarscheinungen wird der Rand immer noch grün. Das Papier ist sehr gut brauchbar für das Abstumpfen der Reaktion auf ein p_H von etwa 9,2 bis 9,4. Bei Wertbestimmungen von Morphin in Opium, wo man das p_H auf etwa 9,2 bringen muß (isoelektrischer Punkt des Morphins, der minimalen Löslichkeit des Alkaloids entsprechend), könnte die Anwendung des Papiers von Bedeutung sein. Ein Papier, das aus einer 0,1 %igen Phenolphthalein- und 0,1 %igen α -Naphtholphthaleinlösung bereitet ist, ist beim p_H 9,4 noch rein grün, bei 9,6 schwach rosaviolett mit grünem Ring, bei 9,8 rotviolett. Für das Abstumpfen des Säuregrades auf ein p_H von 9,7 ist es sehr geeignet.

Brauchbare Papiere erhält man auch aus Kresolrot 0,1 % und Thymolblau 0,25 % bzw. Kresolrot 0,1 % und Thymolblau 0,1 %.

Das erste Papier wird von einem Puffergemisch mit p_H 8,4 rosa gefärbt, bei 8,6 rotviolett, bei 7,4 bis 8,4 unscharf bläulichgrau. Das zweite Papier wird bei p_H 7,6 schon deutlich rosa gefärbt. Sehr scharf ausgesprochen sind die Farbdifferenzen nicht.

Zusammenfassung.

Eine neue Reihe „Mischindikatoren“ ist angegeben und ihre Anwendungsmöglichkeit besprochen worden.

Ein gutes Indikatorpapier wird aus einer Kombination von α -Naphtholphthalein und Phenolphthalein erhalten.

Ein neues Vakuum-Widerstandsgefäß für Leitfähigkeitsbestimmung und konduktometrische Maßanalyse.

Von

Igor Remesow.

(Eingegangen am 19. Juli 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Zu den wesentlichen Hindernissen bei der Bestimmung der Leitfähigkeit von Elektrolyten sowohl, wie bei der konduktometrischen Titration und Fällungsanalyse gehört die Schwierigkeit, die Temperatur der im Gefäß befindlichen Flüssigkeit während der Dauer der Messungen auf konstanter Höhe zu erhalten. Ohne auf die aus der Literatur bekannten Angaben über die Bedeutung der Temperatur, des Temperaturquotienten, der genauen Leitfähigkeitsbestimmungen einzugehen [vgl. *Kohlrausch* (1) (2), *Holborn* (1), *Clausen* (3), *von Heryes* (4), *Déguisne* (5), *Kolthoff* (6), *Dutoit* (7) u. a.] möchte ich hier nur hervorheben, daß die Leitfähigkeit mit der Erhöhung der Temperatur auf je 1° C durchschnittlich um 2% ansteigt.

Die Vorkehrungen, die bisher getroffen wurden, um die Temperaturschwankungen zu vermeiden, bestanden entweder in der Anwendung genau regulierbarer Thermostaten, in die das Gefäß mit der zu untersuchenden Flüssigkeit gebracht wurde, oder in der vor der Messung vorgenommenen Erwärmung der Flüssigkeit oder des Gefäßes [*Dutoit* (7)].

Um auf eine sehr bequeme Weise die gewünschte Temperaturkonstanz zu erhalten, konstruierte ich ein neues „Vakuumwiderstandsgefäß“, das im Nachstehenden beschrieben wird.

Auf der Abb. 1 ist das Gefäß im senkrechten Durchschnitt dargestellt. Es besteht aus zwei Hauptteilen, dem Gefäß und dem Deckel. Das Gefäß (V) stellt ein doppelwandiges Vakuumgefäß, nach der Art der *Deuverschen* Gefäße, dar. Entsprechend der Stärke beider Wandungen des Gefäßes

und dem Grade der Luftverdünnung wird erreicht, daß das Gefäß bei einem Temperaturüberschuß von (t^0) über die der Umgebung einen Temperaturverlust von etwa ($t^0/100$) pro Stunde erleidet, und es genügt zur Erhaltung dieser Differenz eine Energiezufuhr von (0.0001 . t) Watt. Das Gefäß ist versilbert (um etwaigem Wärmeverlust durch Strahlung vorzubeugen), besitzt aber in der Mitte ein Fenster zur Sichtbarmachung des Inhalts. Am obersten Rande des Gefäßes verläuft ein Schliff, damit der genau geschliffene Deckel luftdicht aufgesetzt werden kann.

Der Deckel (D) kann leicht abgenommen werden und trägt die auf ihm montierten Teile des Gefäßes, nämlich die Platinelektroden (E) mit konstantem Abstand, die angelötet sind an die an den Deckel befestigten Glasröhren (G), die Glasröhren führen im Innern starke, amalgamierte Kupferdrähte (Durchmesser = 1,5 mm), die als Leiter dienen, und sie enden nach außen mit zwei Polschrauben (P). Der Kontakt zwischen den Platinelektroden und den Polschrauben ist auf diese Weise völlig gesichert. Außerdem geht durch den Deckel ein fein geschliffenes Thermometer (auf der Abbildung nicht angegeben) mit Teilungen zu $\frac{1}{100}^0 \text{ C}$, mit einstellbarem Nullpunkt (vereinfachter Beckmannscher Behälter), berechnet auf einen Bereich von 2^0 . Ferner geht durch einen besonderen Schliff ein luftdicht eingeschliffener Rührer (R) aus Glas, der es ermöglicht, von oben nach unten und von unten nach oben in durch den Schliff beschränkten Grenzen die Flüssigkeit durchzurühren. In der Mitte des Deckels befindet sich eine Öffnung mit einem eingeschliffenen Glasstöpsel (S), der für Leitfähigkeitsbestimmungen vorgesehen ist. Will man das Gefäß für konduktometrische Titration anwenden, so wird der Stöpsel herausgenommen und in die Öffnung eine genau angeschliffene Mikrobürette (B) eingesetzt,

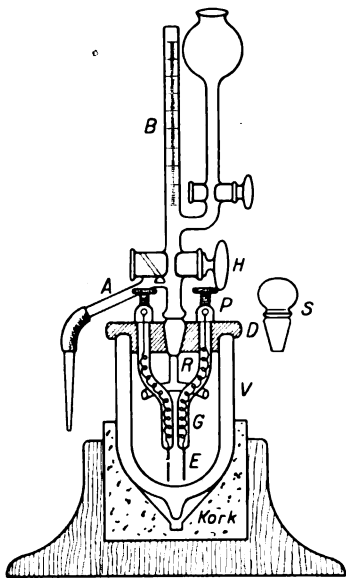


Abb. 1.

die mit einem gläsernen Dreiweghahn (H) und einem Abflußrohr (A) versehen ist. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, bei der konduktometrischen Titration den Meniskus (Nullpunkt) einzustellen, ohne daß man es nötig hat, die Bürette aus dem Gefäß herauszunehmen, wodurch wiederum jede Temperatureinwirkung von außen ausgeschlossen ist. Aber, so ein absolut luftdicht abgeschlossenes Gefäß würde keine Titration ermöglichen, weil die bei der Titration durch die Flüssigkeit verdrängte, oberhalb der zu messenden Lösung befindliche Luft keinen Ausweg hätte, und deshalb könnte keine Flüssigkeit aus der Bürette nachgegossen werden. Um dieser Eventualität vorzubeugen, ist der untere Schenkel der Bürette mit einem Abschlußrohr versehen, was auf die Temperatur des Gefäßes keinen Einfluß hat, dafür aber regelrechte Titrierung gestattet und den Druck im Innern des Gefäßes auf der Höhe des während des Versuchs bestehenden atmosphärischen Druckes hält.

Dem Gefäß wird ein besonderes Gabelstativ beigegeben, auf das der vom Gefäß abgenommene Deckel (*D*) aufgesetzt wird, wobei die Gabel in die auf der Innenfläche des Deckels befindlichen Schlitzze eintritt. Von dem Stativ wird z. B. beim Wechsel der Lösung oder beim Platinieren der Elektroden Gebrauch gemacht.

Das ganze Gefäß ist unten auf einer Korkplatte befestigt (Wärmeisulator) und in ein Holzgestell eingesetzt.

Das Gesamtbild des Gefäßes ist auf der Abb. 2 dargestellt.

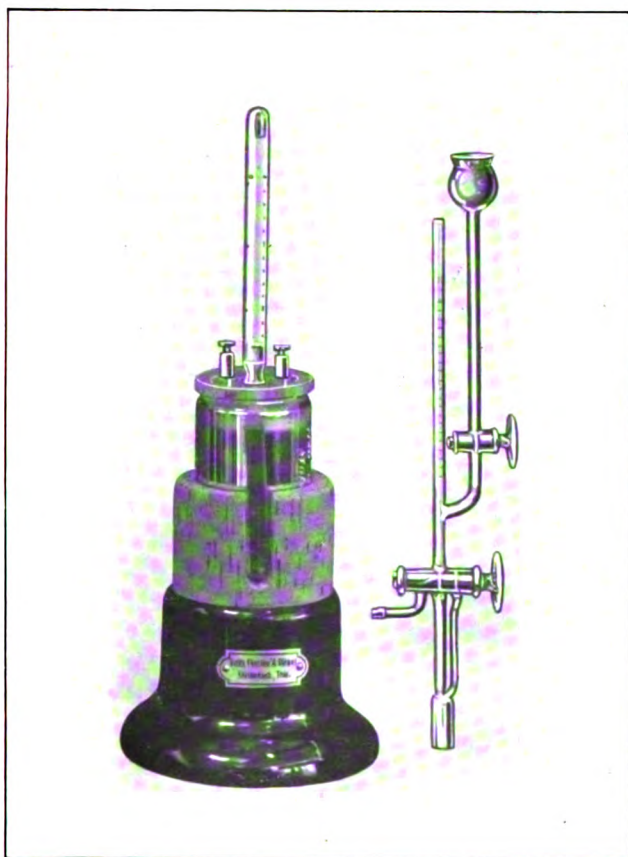


Abb. 2.

Das Gefäß ist berechnet für Leitfähigkeitsmessungen und für konduktometrische Maßanalyse von Elektrolyten mit elektrolytischem Widerstand von nicht unter 10 und nicht über 50000 Ohm. Die Widerstandskapazität des Gefäßes bewegt sich zwischen 0,20 und 0,15, so daß die Leitfähigkeit der gebräuchlichsten Verdünnungen von 0,1, 0,01 bis 0,0001 n Lösungen bestimmt werden kann.

Ausführung der Messungen.

Zur Vornahme von Messungen wird das Gefäß in den Stromkreis der *Wheatstoneschen* Brücke eingeschaltet und ist für das Verfahren zur Leitfähigkeitsbestimmung nach *Kohlrausch* oder seine üblichen Modifikationen verwendbar.

Zur *Bestimmung der Leitfähigkeit* wird der Stöpsel (*S*) des Gefäßes herausgenommen, vorausgesetzt, daß die Elektroden bereits platinisiert sind und die Widerstandskapazität des Gefäßes bereits ermittelt ist. Nun wird das Gefäß mit Leitfähigkeitswasser gespült, dann mit der zu messenden Lösung nachgespült. Jetzt wird in das Gefäß eine genau abgemessene Menge der betreffenden Flüssigkeit eingegossen (man achte, daß die Elektroden vollständig von Flüssigkeit bedeckt sind), das Gefäß mit dem Stöpsel verschlossen, das Thermometer auf den Nullpunkt eingestellt (Trennung der Quecksilbersäule in dem Behälter), und es wird nun die Bestimmung vorgenommen (schnelles Arbeiten ist erforderlich, weil die Flüssigkeit bei starken Strömen einen *Joulschen* Wärmeeffekt zeigen könnte). Im Laufe von etwa 28 Minuten nach dem Moment der Einschaltung des Stromes bleibt die Temperatur gänzlich unverändert. Auf diese Weise verläuft die Messung (die gewöhnlich noch bedeutend weniger Zeit beansprucht) bei völlig konstanter Temperatur. In einer Reihe von vorgenommenen Messungen zur Bestimmung „ κ “ (spezifische Leitfähigkeit) verschiedener Elektrolyten betrug die Genauigkeit 0,05 bis 0,01 %.

Die Prüfung des Gefäßes auf Wärmeretention hat folgende Werte ergeben:

Außen: Kältegemisch t^0 :		Innen: $t^0 = \text{konstant.}$	
0 bis 0,5°		über 15 Minuten	
— 10 „ — 14°		15 „	
— 16 „ — 21°		bis 11 „	
Wärmegemisch t^0 :			
+ 100°		über 15 Minuten	
+ 110°		„ 15 „	
+ 150°		bis 12 „	

Auf diese Weise ist das Gefäß während der Ausführung der Leitfähigkeitsbestimmung der Elektrolyten praktisch völlig isoliert von den Einwirkungen der Außentemperatur.

In Anbetracht jedoch der Empfindlichkeit des Gefäßes gegenüber den Veränderungen der Temperatur der in ihm enthaltenen Lösung, müssen die Einflüsse des Bestimmungsverfahrens selbst auf die Temperatur der Lösung vermieden werden, wie etwa Er-

wärmung des Elektrolyten infolge zu langer Dauer der Stromleitung, starke Polarisierung usw.

Zur Vornahme von konduktometrischen Titrierungen [Kolthoff (8)] wird das Gefäß, unter genauer Beobachtung aller in den einschlägigen Lehrbüchern beschriebenen Kautelen, wie vorstehend angegeben vorbereitet und an der Stelle des Stöpsels mit der Mikrobürette (*B*) versehen, die die zu prüfende Lösung (gewöhnlich in einer 20- bis 100mal stärkeren Konzentration als die zu titrierende Flüssigkeit) enthält; der Dreiweghahn gestattet leichte Einstellung des Nullpunktes, wenn die Bürette einen Überschuß der Lösung enthält, dadurch, daß der Überschuß der Flüssigkeit durch das Abflußrohr entfernt wird, daß die Bürette aus der Öffnung herausgenommen wird. Während der Titrierung wird die Flüssigkeit einmal in der Minute durch Hochhebung und Senkung des Rührers durchgerührt (vorsichtig, um die Elektroden nicht zu berühren), wobei die eigentlichen Leitfähigkeitswerte nach dem Rühren gemessen werden müssen. Dabei zeigt die Temperatur ein regelmäßiges Ansteigen (Neutralisationswärme).

Nach dem Stillstehen des Anstiegs, d. h. vom Moment der Neutralisation an, bleibt die Temperatur konstant.

Die von uns zur Prüfung des Gefäßes vorgenommenen konduktometrischen Titrierungen einiger Reihen von starken und schwachen Säuren und Basen nach Kolthoff (8) haben außerordentlich lehrreiche Kurven mit deutlichen Knickpunkten der Neutralisationskurven (z. B. für $n/10$ Borsäure, $n/10$ -Essigsäure usw.) ergeben.

Bei der konduktometrischen Titration ist es freilich nicht erforderlich, die Leitfähigkeitswerte des betreffenden Elektrolyten-gemisches im gegebenen Moment zu kennen, da es nur auf die sprunghafte Veränderung der Leitfähigkeit im Moment der Neutralisation und auf das entsprechende Quantum der eingegossenen Lösung in Kubikzentimetern ankommt. Immerhin ist es bei der Anwendung des vorstehend beschriebenen Gefäßes leicht, in jedem Augenblick die wirklichen Werte der Leitfähigkeit des titrierten Gemisches zu ermitteln. Dazu wird bei der Bestimmung der „ κ “ die Temperaturkorrektur (Neutralisationswärme), die durch Ablesung auf dem Thermometer und nach der Formel:

$$N = 14617 - (1 - \gamma) \cdot D \text{ Cal.}$$

(N — bedeutet die Neutralisationswärme, γ — den Dissoziationsgrad der freien Säure und D — ihre Dissoziationswärme pro Grammäquivalent), bestimmt wird, wie auch die Korrektur in bezug auf die Widerstandskapazität des Gefäßes, die sich mit der Volumenveränderung der im Gefäß enthaltenen Flüssigkeit ändert (und gerade bei Titrationen ist es der Fall) vorgenommen.

Aus der Kurve (Abb. 3) ist die Abhängigkeit der Größe „ C “ der Widerstandskapazität des Gefäßes von der Volumenänderung der Flüssigkeit im Gefäß ersichtlich und tritt deutlich als Funktion des Volumens hervor:

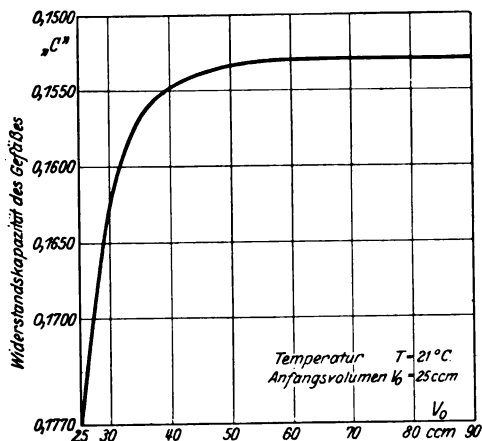


Abb. 3.

Kurve der Abhängigkeit der Veränderungen der Widerstandskapazität „ C “ des Gefäßes von der Volumenveränderung „ v “ des im Gefäß enthaltenen Elektrolyten. Auf die Ordinate sind die Werte von „ C “ aufgetragen (berechnet nach der Formel: $C = \kappa \cdot W$); auf die Abszisse die Volumina der Lösung in cm.

$C = f(v)$, und gestattet es jeden Augenblick, die erforderliche Korrektur der Größe „ C “ an der Kurve einfach abzulesen.

Zusammenfassung.

Das neue Vakuumwiderstandsgefäß ermöglicht:

1. Die Ausführung von Leitfähigkeitsbestimmungen bei vollständig konstanter Temperatur ohne Anwendung von Thermostaten oder anderen Hilfsmitteln zur Erhaltung der Temperatur; dadurch wird

eine Genauigkeit der Bestimmungen bis zu 0,05% im Rahmen der Genauigkeit der Bestimmungsmethode erreicht.

2. Die Ausführung von konduktometrischen Titrierungen mit eventueller Ermittlung der wirklichen Leitfähigkeitswerte der betreffenden Lösung im gegebenen Moment.

Das neue Vakuumwiderstandsgefäß (D. R. P. angem.) ist von der Firma Fischer und Röwer, Stützerbach in Thüringen, zu beziehen.

Literatur.

- 1) Kohlrausch und Holborn, Leitvermögen der Elektrolyte, 2. Aufl. —
- 2) Kohlrausch, Sitzungsber. d. Kgl. Preuß. Akad. d. Wiss., Physik.-Mathem. Kl. **26**, 572, 1902. — 3) Clausen, Ann. d. Phys. **37**, 51, 1912. — 4) von Hevesy, Zeitschr. f. Elektrochem. **27**, 21, 1921. — 5) Déguisne, Diss. Straßburg 1895. — 6) Kolthoff, Zeitschr. f. anorg. Chem. **111**, 1, 28, 52, 1920; **112**, 155, 172, 187, 196, 1920. — 7) Dutoit, Bull. Soc. Chim. de France **7**, 1, 1910; Journ. de Chim. Phys. **8**, 12, 27, 1910. — 8) Kolthoff, Konduktometrische Titration. Dresden-Leipzig, Verlag Steinkopff, 1923.

Beiträge zur Frage des Hexosenabbaues in der Pflanze.

I. Mitteilung:

Über den Zymaseapparat der Samen.

Von

W. Zaleski und Olga Pissarjewsky.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium zu Charkow.)

(Eingegangen am 20. Juli 1927.)

Unsere noch nicht publizierten Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Faktoren auf den Hexosenabbau in keimenden und reifenden Samen haben uns zum Studium der Wirkung derselben auf einige Stadien dieses Prozesses geführt. Es erwies sich als nötig, die Wirkung dieser Faktoren auf die Gärungs- und Atmungsprozesse der Samen einzeln zu untersuchen. Zuerst haben wir uns die Aufgabe gestellt, das Wirkungsvermögen des Gärungsapparats während der Keimung und Reifung der Samen zu verfolgen und zu diesem Zwecke zunächst das Gärungssystem selbst zu untersuchen. Diese letzte Aufgabe stellt nun den Zweck vorliegender Mitteilung dar.

Eine Reihe von Forschern bemühte sich zu beweisen, daß sich die Alkoholgärung der höheren Pflanzen in wesentlichen Punkten wie die der Hefe verhält. Zuerst ist es gelungen, zu konstatieren, daß einige abgetötete Pflanzen nicht nur ohne Sauerstoffzutritt, sondern auch in der Luft eine typische Alkoholgärung zu vollziehen vermögen, daß sie also ein der Hefezymase ähnliches Enzym enthalten¹. Die grundlegenden Untersuchungen von *Harden* und *Young* über die Teilnahme der Phosphate und eines Coferments an der Alkoholgärung der Hefe lenkten die Aufmerksamkeit anderer Forscher auf das Studium der Beteiligung dieser Faktoren an den Prozessen der alkoholischen Gärung der höheren Pflanzen.

Ausgehend von der stimulierenden Wirkung der Alkaliphosphate auf die Hefegärung, studierten einige Forscher den Einfluß derselben auf die Alkoholgärung der höheren Pflanzen². Es ist ihnen gelungen, festzustellen, daß alkalisch reagierende Phosphate die Alkoholgärung der abgetöteten Pflanzen stark stimulieren können. Eine solche Wirkung der Phosphate

¹ Literatur s. *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen 2, 1926.

² Literatur bei *J. Bodnár*, diese Zeitschrift 165, 1, 1925.

auf die Alkoholgärung der abgetöteten Pflanzen haben einige Forscher der Bildung von Zuckerphosphorsäureestern, als einer wesentlichen Durchgangsstufe des Hexosenabbaues, zugeschrieben. Dennoch haben die Bemühungen, den Prozeß der Phosphatbindung bei höheren Pflanzen zu finden, lange Zeit zu keinem positiven Resultat geführt. Erst vor kurzem hat *Bodnár*¹ die Fähigkeit zur Phosphorylierung bei Erbsensamen nachgewiesen, und so ist das Vorhandensein von Zuckerphosphorsäureestern bei höheren Pflanzen wahrscheinlich gemacht worden. Dennoch gibt *Bodnár* keine Antwort über die Natur und die Rolle der bei der Alkoholgärung der Erbsensamen gebildeten organischen Phosphorverbindungen.

Die Frage nach der Teilnahme des sogenannten Coferments an der alkoholischen Gärung der höheren Pflanzen ist auch verwickelt und unklar. *Harden* und *Young*² haben gezeigt, daß Hefepreßsaft durch Dialyse in zwei Teile geschieden werden kann, welche beide an sich unwirksam, durch Vermischen gärungswirksam werden. Ein Bestandteil der Zymase ist ein thermolabiles Enzym, der andere ein thermostabiles Coferment. Ein ähnlicher Stoff läßt sich aus den tierischen Geweben extrahieren, und ist er am meisten in der Muskulatur vorhanden. Nach *Euler*³ kommt ein Coferment für Hefe in den Pflanzen nicht oder kaum vor.

Die Bemühungen, ein Coferment für die Zymase der höheren Pflanzen zu finden, haben lange Zeit zu keinem positiven Resultat geführt. Erst unlängst hat *Bodnár*¹ das Zymasystem der Samen nach der Methode von *Harden* und *Young* in zwei Komponenten: Ferment und Coferment (Apozymase und Cozymase) eingeteilt. Der Verfasser schreibt: „Werden Erbsen- und Lupinenmehl der Dialyse unterworfen, so bekam man solche Mehle, welche höchstens in Spuren CO_2 und Alkohol ausscheiden, aber durch die Wirkung der wässerigen Extrakte dieser Mehle ihre Aktivität zurückgewannen“. Der gekochte wässrige Extrakt des Erbsenmehls aktiviert nach *Bodnár* auch die CO_2 -Produktion des nativen Erbsenmehls, wie in der Luft, so auch im Wasserstoff. Weiter sagt der Verfasser, daß „die alkoholische Gärung des dialysierten Mehles durch coenzymhaltigen Trockenhefeextrakt nicht zurückgestellt wird“. Daraus folgert der Verfasser, daß die Hefe-Cozymase das Coenzym der pflanzlichen Zymase nicht ersetzen kann. Die Wirkung des Trockenhefeextrakts auf die CO_2 -Ausscheidung des nativen Mehles erklärt der Verfasser dadurch, daß dieser „solche Substanzen enthält, aus welchen durch Einwirkung der Carboxylase der pflanzlichen Objekte CO_2 und Acetaldehyd entsteht“. In der von *Bodnár* gegebenen Fassung hat also ein von *Zaleski*⁴ schon längst eingenommener Standpunkt keine grundsätzliche Änderung erfahren. Dennoch hat *Zaleski* eine stimulierende Wirkung der Trockenhefeextrakte auf zweierlei Weise

¹ *J. Bodnár*, l. c.

² *A. Harden* und *W. J. Young*, Proc. Roy. Soc. Ser. B. 77, 405, 1906; 78, 368, 1906.

³ *H. v. Euler* und *K. Myrbäck*, zit. nach *C. Oppenheimer*, l. c.

⁴ *W. Zaleski*, Ber. bot. Ges. 31, 1913.

gedeutet: „Der Hefanolextrakt enthält solche Stoffe, die die Wirkung der Gärungsfermente, wie z. B. Hefe-Coenzym tut, stimulieren oder eine Vorstufe der Brenztraubensäure, die durch Carboxylase vergoren wird.“

Um diesen Widerspruch zu erklären, haben wir die Versuche mit dem dialysierten Mehl angestellt.

Das Erbsenmehl wurde in der von *Bodnár* beschriebenen Weise der Dialyse unterworfen, abfiltriert, getrocknet und dann fein zermahlen. Das dialysierte Mehl wurde mit einer entsprechenden Menge destillierten Wassers oder des aus Trockenhefe, Froschmuskeln und verschiedenen Samen bereiteten Extrakts und Toluol (5 bis 10 %) versetzt, auf dem Boden und den Wänden des Rezipienten in einer dünnen Schicht verteilt und auf eine bestimmte Zeit bei 20 oder 30° stehengelassen. In einigen Fällen wurden die Gefäße evakuiert und dann luftdicht geschlossen. Nach beendigem Versuch wurden einige Kubikzentimeter verdünnter Schwefelsäure einfließen gelassen, und dann wurde die von den Objekten ausgeschiedene Kohlensäure mit Bariumhydroxydlösung absorbiert und in üblicher Weise bestimmt. Zur Alkoholbestimmung, wenn diese mit CO₂-Bestimmung verbunden war, wurde eine unter denselben Bedingungen eingestellte Probe wie zur CO₂-Bestimmung benutzt.

Zur Bereitung von Hefeextrakt wurden 2 g gepulverter Trockenhefe mit einer entsprechenden Menge destillierten Wassers versetzt und einige Minuten lang gekocht. Diese Mischung wurde der Einfachheit wegen direkt verwendet. Zwecks Bereitung des Muskelextrakts haben wir Hinterbeine von Fröschen (15 bis 18 g) fein zerschnitten, mit dem gleichen Gewicht destillierten Wassers versetzt und zum Kochen erhitzt. Dann wurde der Extrakt abfiltriert und zu den Versuchen benutzt. Zur Herstellung des Kochsaftes der Samen wurden je 20 g Mehl derselben mit 100 ccm Wasser und 2 bis 4 ccm Toluol vermischt, 1 bis 2 Stunden stehengelassen und dann abfiltriert. Das Filtrat wurde im Wasserbad ein wenig eingeeengt und die Flüssigkeit abfiltriert oder einfach abgessen und zu den Versuchen benutzt.

Versuch I bis III.

Je 5 g dialysierten Erbsenmehls + 5 ccm destillierten Wassers oder der unten erwähnten Extrakte. Versuchsdauer 20 Stunden. $T = 20^{\circ}$. $p_H = 6,5$ bis $6,8$.

Extrakte aus	CO ₂ in mg			Alkohol in mg		
Trockenhefe	13,1	14,2	16,5	13,5	14,8	16,6
Muskeln	14,0	14,2	16,0	14,9	14,6	15,9
Erbsensamen	14,2	13,5		14,5	14,2	
Pferdebohnen	7,8	7,6		Nicht bestimmt		
Weizensamen	6,0	6,5		"	"	
Sonnenblumensamen . .	3,0			"	"	
Wasser	1,0	1,2		Spuren		
				3 *		

Zuerst bestätigen wir die Angaben von *Bodnár*, daß das aus Erbsensamenmehl durch Dialyse erhaltene inaktive Mehl, das höchstens in Spuren CO_2 und Alkohol bildet, durch Zusatz von aufgekochtem Mehlextrakt seine Aktivität zurückgewinnt. Wir stimmen dem Verfasser bei, daß zur Wirkung der Erbsenzymase ein Stoff notwendig ist, der als Coenzym fungiert, und den wir als spezifischen Aktivator bezeichnen wollen. Zurzeit wissen wir nur, daß dieser Aktivator die Bedingungen für die Zymasewirksamkeit schafft. Wir wissen aber nicht, ob zur Einleitung der Alkoholgärung der Erbsensamen eine Aktivierung der Zymase oder ihres Zustandes nötig ist.

Weiter zeigen unsere Versuche, daß die Fähigkeit des dialysierten Erbsenmehls zur Alkoholgärung auch durch Wirkung des Hefe- und Muskelextrakts restituiert wird. Schwach wirken die Extrakte aus Weizensamen und Pferdebohnen, und noch schwächer die der Sonnenblumensamen.

Schon längst haben *Zaleski*¹ und *Iwanoff*² gezeigt, daß die Trockenhefeextrakte auf die Alkoholgärung des nativen Erbsenmehls stimulierend wirken. Wir haben jetzt gezeigt, daß auch Muskelextrakt ebenso wirkt. Es ist daher die Schlußfolgerung berechtigt, daß dieser gemeinsamen Wirkungsweise ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegt. Wir haben auch nachgewiesen, daß Trockenhefeextrakt auch die Alkoholgärung des Mehles der Erbsenkeimpflanzen stimuliert, so z. B.:

Versuch IV.

Je 10 g Mehl der Erbsenkeimpflanzen + 12 ccm 1. Wasser, 2. Trockenhefeextrakt. Versuchsdauer 20 Stunden. $T = 30^\circ$.

Alter der Keimpflanzen in Tagen	Wasserportion		Trockenhefeportion	
	CO_2 mg	Alkohol mg	CO_2 mg	Alkohol mg
1	65,8	60,2	110,2	120,4
3	50,6	54,0	100,6	108,1
5	32,8	30,0	68,2	60,1

Es ist selbstverständlich, daß die oben genannten Extrakte, die eine Unmenge verschiedener Stoffe enthalten, auf das dialysierte und native Mehl auch ungleich wirken können. Im ersten Falle gärt das Mehl ohne Komplementzusatz gar nicht, im zweiten ist dieses vorhanden, und in seiner Gegenwart können auch andere Aktivatoren wirken.

¹ W. Zaleski und A. Reinhard, diese Zeitschr. 35, 228, 1911.

² L. Iwanoff, Ber. bot. Ges. 31, 1911.

So zeigen unsere in einer anderen Arbeit beschriebenen Versuche, daß Methylenblau, Hydrochinon und Brenzcatechin unter bestimmten Bedingungen eine stimulierende Wirkung auf die Alkoholgärung des nativen Erbsenmehls ausüben können, aber auf die des dialysierten wirken sie gar nicht. Weiter befördern alkalisch reagierende Phosphate nur die Alkoholgärung des nativen Mehles.

Wir haben die Wirkung verschiedener Wasserstoffdonatoren und Wasserstoffakzeptoren auf die Alkoholgärung des dialysierten Erbsenmehls geprüft, aber kein positives Resultat erhalten.

Der Grad der Wirkung des Aktivators der Erbsenzymase ist je nach Menge und Zustand derselben verschieden.

Versuch V.

Das Mehl der unreifen und ganz reifen Samen wurde der Dialyse unterworfen. Zum Vergleich wurden die Samen mit 100 und 30 Keimprozent genommen. Das dialysierte Mehl wurde mit Wasser und Trockenhefeextrakt versetzt. Versuchsdauer 20 Stunden. $T = 20^{\circ}$.

	CO ₂ in mg		
	Unreifer Samen (4 g)	Samen mit 100 Keimprozent (10 g)	Samen mit 30 Keimprozent (10 g)
Wasserportion	3,6	1,2	1,2
Trockenhefeportion	26,4	24,3	12,0

Die Energie der Arbeit der Zymase hängt also nicht nur von der Menge des Komplements, das in diesem Falle in einem Überschuß vorhanden ist, sondern auch von der Beschaffenheit des Ferments ab. Es spielen dabei die Menge, Konzentration und der Zustand der Zymase eine wichtige Rolle.

Es drängt sich nunmehr die Frage auf, ob wir dazu berechtigt sind, diesen Aktivator der Erbsenzymase, der die Extrakte der Hefe, Muskeln und Erbsensamen enthält, und der als Coferment wirkt, mit der Cozymase der Hefe zu vergleichen.

Was zuerst die chemische Natur dieses Aktivators der Erbsenzymase betrifft, so kann man nach unseren noch im Gange befindlichen Untersuchungen vorläufig sagen, daß er eine Reihe der Eigenschaften hat, die man der Hefe-Cozymase zuschreibt. So ist dieser Stoff relativ thermostabil, wird durch Alkohol, Bleiacetat und Tannin gefällt und durch Kaliumcarbonat zerstört.

Dieser Aktivator wird aus Trockenhefe beinahe vollständig mit 50 %igem Alkohol extrahiert und durch 80 %igen Alkohol gefällt.

Versuch VI.

Zuerst extrahierten wir Trockenhefe mit 95 %igem Alkohol zweimal 1 Stunde lang auf dem Wasserbad mit Rückflußkühler. Eine kleine Portion

der extrahierten Hefe wurde getrocknet, die übriggebliebene wurde nach und nach mit 80- und 50 %igem Alkohol in derselben Weise extrahiert und dann auch getrocknet. Die extrahierten Stoffe wurden zur Bereitung der Extrakte benutzt.

Je 10 g dialysiertes Erbsenmehl + 12 ccm 1. Wasser, 2. Trockenhefeextrakt, 3. Extrakt aus der mit Alkohol extrahierten Hefe.

Wasser	1,5 mg CO ₂
Trockenhefeextrakt	16,4 „ CO ₂
Hefe extrahiert mit 95 %igem Alkohol	16,2 „ CO ₂
„ „ „ 80 „ „	15,8 „ CO ₂
„ „ „ 50 „ „	4,5 „ CO ₂

Versuch VII.

Je 2 g Trockenhefe wurden mit Wasser unter Toluolzusatz 4 Stunden lang stehengelassen und dann mit absolutem Alkohol bis auf 50 bis 80 % versetzt. Der so erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Alkohol ausgewaschen, getrocknet und zur Bereitung des Extrakts benutzt.

Je 10 g dialysiertes Mehl + 12 ccm des Trockenhefeextrakts:

Hefe durch 50 %igen Alkohol gefällt	13,8 mg CO ₂
„ „ 80 „ „ „	22,4 „ CO ₂

Der Aktivator wird durch andere Stoffe adsorbiert und dadurch durch 50 %igen Alkohol mit gefällt.

Der Aktivator wird nicht durch Kupfersulfat und Calciumhydroxyd nach der Methode von *Salkowski* gefällt.

Zuletzt haben wir diesen Aktivator genau nach Vorschrift von *Euler*¹ aus dem Erbsensamenextrakt mit Bleiacetat gefällt und dann nach Entfernung des Bleies und Schwefelwasserstoffs in einem Falle direkt durch Alkohol, im anderen zuerst durch Tannin und dann durch Alkohol gefällt. Die so erhaltenen Niederschläge wurden auf dem Filter gesammelt und dann getrocknet. Das Filter wurde mit Wasser extrahiert und die Lösung zu den Versuchen benutzt, da die Substanzmenge zu gering war.

Versuch VIII.

Je 10 g dialysiertes Mehl + 12 ccm Präparatlösung.

Präparat I	15,2 mg CO ₂
„ II	14,6 „ CO ₂
Wasser	1,2 bis 1,4 „ CO ₂

Wir hoffen, diesen Aktivator in einer größeren Menge zur Untersuchung seiner chemischen Natur zu erhalten.

Die Rolle und die Teilnahme des Komplements der Erbsenzymase an der Alkoholgärung ist unklar. In Anbetracht der oben angeführten

¹ *Euler* und *Myrbäck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 188, 1924; 189, 1924.

Tatsachen hätte man erwarten können, daß der Aktivator bei der Alkoholgärung der Erbsen dieselbe Rolle wie die Cozymase der Hefegärung spielt.

Man nimmt an, daß die Hefe-Cozymase eine gewisse Rolle im ersten Akte der Gärung spielt, da sie an der Phosphorylierung der Hexosen notwendigen Anteil nimmt. In der Tat, wenn man nach *Euler*¹ untergärrige Hefen auswäscht, bis sie nicht mehr gären, so phosphorylieren sie auch nicht mehr. Nur durch Hefekochsaftzusatz gewinnt die Trockenhefe ihre Fähigkeit zur Phosphorylierung wieder. Dieselben Rassen der Hefe, die schlecht oder gar nicht phosphorylieren, enthalten meist auch keine Cozymase. Es ist also klar, daß die Hefe-Cozymase in einem solchen Stadium der Hefegärung eine Rolle spielt, die mit Phosphatbindung verbunden ist.

Den Prozeß der Phosphatbindung bei den Erbsensamen hat vor kurzem *Bodnár*² nachgewiesen. Diesen Befund können wir jetzt bestätigen, dennoch ist die Natur und die Rolle der gebildeten Produkte noch unbekannt. Aber wenn wir sogar annehmen, daß die Phosphatbindung bei Erbsengärung dieselbe Rolle wie bei der Hefegärung spielt, so müssen wir auch in diesem Falle dem Aktivator der Erbsenzymase eine andere Rolle in der Alkoholgärung zuschreiben.

So zeigen unsere in einer anderen Arbeit beschriebenen Experimente, daß das dialysierte Erbsenmehl auch nach Zusatz von aus Muskeln, Hefe und Erbsensamen bereitetem Extrakt nicht zu phosphorylieren vermag. Wenn wir in einem noch nicht näher bestimmten Falle Phosphorylierung bei dem dialysierten Mehle ohne Kochsaftzusatz beobachteten, so spricht auch diese Tatsache, wenn sie richtig ist, nicht zugunsten einer Beteiligung des Aktivators an der Phosphatbindung.

Es ist wahrscheinlich, daß die Phosphatbindung kein normales Zwischenstadium des Hexosenabbaues bei den höheren Pflanzen darstellt. So konnten wir keine Phosphatbindung in den unreifen Erbsensamen finden, und dennoch ist die Alkoholgärung derselben sehr energisch. Unsere Bemühungen, Phosphatbindungsprozesse in Samen anderer Pflanzen zu finden, haben bis jetzt zu keinem positiven Resultat geführt. Wir haben also diesen Prozeß nur bei reifen Erbsensamen nachgewiesen.

Wie es auch sei, jedenfalls ist es klar, daß dieser unbekannte Aktivator der Alkoholgärung der Erbsensamen und die Hefe-Cozymase nicht wirkungsidentisch sind.

Man kann vermuten, daß das Erbsenmehl auch das längst gesuchte Coferment der Zymase enthält, dieses aber so fest gebunden ist, daß

¹ *Euler* und *K. Myrbäck*, Zeitschr. f. phys. Chem. **139**, 1925.

² *J. Bodnár*, l. c.

es durch Dialyse nicht entfernt werden kann. In diesem Falle wäre es möglich, unsere Versuche über den Phosphatbindungsprozeß bei Erbsen einfacher zu deuten, aber vorläufig haben wir keinen experimentellen Grund zu dieser Vermutung.

Und zuletzt müssen wir uns die Frage stellen, ob dieser unbekannte Aktivator eine Kinase darstellt, die Zymasezymogen aktiviert. Die Existenz des Zymasezymogens ist aber unbewiesen.

Schon früher behauptete *Iwanoff*¹, daß Erbsensamen ein Zymasezymogen enthalten, und vor kurzem versuchte *Bodnár*², diese Ansicht zu bestätigen. Zugunsten dieser Annahme spricht nur die Tatsache, daß das Erbsenmehl in der Luft mehr CO₂ und Alkohol als im Vakuum bildet, aber wenn man es 1 bis 1½ Tage lang Sauerstoff absorbieren läßt, so gärt es in beiden Fällen gleich stark. Es ist klar, daß der Sauerstoff die Alkoholgärung des Erbsenmehls stimuliert, aber diese Tatsache kann in verschiedener Weise gedeutet werden. So z. B.:

Versuch IX.

Je 10 g Mehl der unreifen und gereiften ruhenden Erbsensamen mit 100 und 30 Keimprozent + 12 cem Wasser. Versuchsdauer 20 Stunden. $T = 23^{\circ}$.

Samen	In der Luft			Im Vakuum		
	CO ₂ mg	Alkohol mg	Alkohol CO ₂	CO ₂ mg	Alkohol mg	Alkohol CO ₂
Unreifen	51,8	51,5	100	32,4	30,0	94
Mit 100 Keimprozent	42,5	40,4	95	30,6	31,4	101
" 30 "	20,5	20,8	100	20,4	20,9	100

Die Differenz der an der Luft und im Vakuum gebildeten CO₂- und Alkoholmengen ist bei unreifen Samen etwas größer als bei gereiften, ruhenden. Es ist kaum zu denken, daß die unreifen Samen relativ mehr Zymasezymogen als die ruhenden enthalten.

Weiter müssen wir schließen, daß schlecht keimende Samen kein Zymasezymogen enthalten, da sie in der Luft ebensoviel CO₂ als im Vakuum ausscheiden, oder daß sich Zymase aus ihrem Zymogen ohne Sauerstoffzutritt bildet. Die Annahme der Existenz des Zymogens kommt uns aber sehr bedenklich vor.

Die Wirkung des Sauerstoffs auf die Alkoholgärung des Erbsenmehls kann man in einer anderen Weise deuten.

¹ L. *Iwanoff*, l. c.

² J. *Bodnár*, l. c.

Unsere Versuche zeigen, daß dieser unbekannte Aktivator der Alkoholgärung des Erbsenmehls verschieden stark an irgendwelche Kolloide seines natürlichen Mediums adsorbiert wird.

Versuch X.

Je 10 g dialysiertes Mehl der unreifen Samen + 5 ccm Wasser und Trockenhefeextrakt. Versuchsdauer 48 Stunden. $T = 22^\circ$.

nach	24	48 Stunden
Wasser	3,6	3,7 mg CO_2
Trockenhefeextrakt	26,4	17,4 „ CO_2

Wir haben schon oben gesehen, daß das dialysierte Mehl der ruhenden Samen höchstens in Spuren CO_2 ausscheidet. Hingegen bildet das dialysierte Mehl der unreifen Samen eine merkliche CO_2 -Menge. Der Aktivator wird also in den unreifen Samen fester als in ruhenden gebunden.

Wir vermuten, daß der Sauerstoff nicht nur die Bildung und Freilegung des Aktivators stimuliert, sondern auch diesen gegen angreifende Wirkung anderer Fermente stützt. Auf diese Weise kann man eine stimulierende Wirkung des Sauerstoffs auf die Alkoholgärung der Erbsensamen einfacher erklären, als wenn man die Existenz des zufälligen Zymogens annimmt. Es ist auch möglich, daß der Sauerstoff unter bestimmten Bedingungen den Aktivator der Gärung auch oxydieren kann. Durch die Bildung und Zerstörung des Aktivators kann die Pflanze die Wirksamkeit des Zymaseapparats regulieren. Die Rolle dieses Aktivators der Alkoholgärung der Erbsensamen gedenken wir eingehender zu untersuchen.

Zuletzt sei erwähnt, daß unsere noch nicht beendigten Versuche zeigen, daß das durch Dialyse inaktiv gewordene Mehl unter den noch nicht näher bestimmten Bedingungen auch ohne Aktivatorzusatz seine Fähigkeit zur Alkoholbildung zurückgewinnt. Diese Tatsache bedarf einer eingehenden Untersuchung.

Hauptergebnisse.

1. Wir haben den Befund von *Bodnár* bestätigt, daß zur Wirksamkeit der Erbsenzymase ein Stoff notwendig ist, den wir vorläufig Aktivator der Erbsenzymase nennen.
2. Den Kochsaft der Erbsensamen kann man durch den der Hefe und Muskel ersetzen. Die Erbsensamen-, Hefe- und Muskelextrakte stimulieren die Alkoholgärung auch des nativen Erbsenmehls.
3. Es wurden die Eigenschaften des spezifischen Aktivators der Erbsenzymase beschrieben. Dieser Aktivator spielt keine Rolle bei

der Phosphorylierung der Hexosen während der Alkoholgärung der Erbsensamen. Man kann nicht diesen Aktivator durch irgendwelche Wasserstoffdonatoren oder Wasserstoffakzeptoren ersetzen, die Rolle derselben ist bis jetzt unklar.

4. Die Annahme der Existenz eines Zymasezymogens ist entbehrlich. Eine stimulierende Wirkung des Sauerstoffs auf die Alkoholgärung der Erbsensamen beruht nicht auf einer Umwandlung des Zymasezymogens in freie Zymase, sondern hängt vermutlich von einer Bildung und Freilegung des Aktivators der Erbsenzymase im Verlauf der Gärung ab.

Über Methyl-n-nonyl-keton aus dem ätherischen Öl der Sojabohne (*Glycine soja* Sieb.).

Von

Hans Schmalfuß und Albert Treu.

(Mitteilung aus dem Chemischen Staatsinstitut Hamburg, Universität.)

(Eingegangen am 21. Juli 1927.)

Das rohe Sojaöl besitzt einen unangenehmen Geruch, der lebhaft an Ausscheidungen gewisser Blattwanzen erinnert.

Wie wir fanden, enthält das ätherische Öl der Sojabohne große Mengen des stark riechenden Methyl-n-nonylketons.

Isolierung des Methyl-n-nonyl-ketons als Semicarbazon.

Wir verseiften das fette Rohöl¹ der Sojabohne mit Kalilauge. Dann bliesen wir das ätherische Öl mit Wasserdampf ab und nahmen es mit Äther auf. Den wasserfreien Verdampfungsrückstand destillierten wir bei einem Druck von 16 mm und verwandelten einen Teil der Fraktion 80° bis 140° in das Semicarbazon. Zu diesem Zweck neutralisierten wir 2,2 g Semicarbazidhydrochlorid vorsichtig mit 30 %iger wässriger Natronlauge, setzten 25 ccm absoluten Alkohols zu und filtrierten vom ausgeschiedenen Natriumchlorid ab. Zum Filtrat fügten wir dann 7,2 g des ätherischen Öles hinzu.

Im Verlauf eines Tages schied sich das Semicarbazon ab, das, auch im Gemisch mit synthetischem Semicarbazon des Methyl-n-nonylketons (F. P. 122°), bei 122° schmolz.

1. 0,004 642 g Substanz: 0,748 ccm N₂ (20°; 760 mm),

2. 0,006 291 g „ 1,025 „ N₂ (23°; 758 „).

Ber. für C₁₂H₂₅ON₃: 18,49 % N,

Gef. 1.: 18,40 % N,

2.: 18,37 % N.

Molekulargewichtsbestimmung (im Depressimeter nach J. F. Eykman²).

1. 0,1180 g Substanz in 4,6615 g Phenol. Depression 0,87°,

2. 0,3280 g „ „ 5,6782 g „ „ 1,93°.

Ber. für C₁₂H₂₅ON₃: 227,

Gef. 1: 210,

2: 216.

¹ Rohmaterial, in dem ätherisches Öl bereits angereichert war, wurde uns von der Firma Noblé & Thörl in Harburg zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle herzlich danken.

² Houben, Die Methoden der organischen Chemie 1, 931, 1925. Thieme, Leipzig.

Kolorimetrische Kalibestimmung in wässerigen Bodenauszügen als Indikator der Düngungsbedürftigkeit.

Von
Antonín Němec.

(Aus den Staatlichen Versuchsanstalten für Pflanzenproduktion in Prag.)

(Eingegangen am 22. Juli 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Ermittlung der Nährstoffbedürftigkeit landwirtschaftlich bebauter Böden für verschiedene Kulturpflanzen durch eine zuverlässige und rasch ausführbare Laboratoriumsmethode stellt eine der wichtigsten praktischen Fragen der heutigen Agrikulturchemie vor. Die Mißerfolge der Anwendung von konzentrierten und verdünnten Mineralsäurelösungen bei Herstellung und Analyse von Bodenauszügen und die Unmöglichkeit, aus diesen Untersuchungen zuverlässige Hinweise auf pflanzenzugängliche Nährstoffreserven zu bekommen, hat in letzten Jahren die Hoffnungen, dieses Problem durch rein chemische Bodenanalysen zu lösen, ziemlich erschüttert. Von den rein chemischen Verfahren haben sich in vielen Fällen nur diejenigen als brauchbar bewährt, welche zur Herstellung von Bodenextrakten sehr verdünnte Lösungen organischer Säuren oder mit Kohlendioxyd gesättigtes Wasser verwenden.

Dies sind namentlich das Verfahren von Dyer¹, bei welchem der Boden mit 1%iger Citronensäurelösung in der Kälte extrahiert wird, und weiter die Methoden von Mitscherlich² und Biéler-Chatelan³, welche zur Gewinnung des Bodenextrakts kohlensäuregesättigtes, destilliertes Wasser benutzen. Nach neueren Untersuchungen von König und Hasenbäumer⁴ hat sich herausgestellt, daß mittelschwere Böden, welche 180 mg K₂O löslich in 1%iger Citronensäure für 1 kg Boden enthalten, mit genügend für Pflanzen aufnehmbaren Kaliverbindungen versorgt sind, um Vollernten

¹ B. Dyer, Transact. Chem. Society, **115**, 115, 1894; Phil. Transact. **194**, B., 235, 1901.

² E. A. Mitscherlich, Landw. Jahrb. **39**, 309, 1909.

³ Biéler-Chatelan, C. r. Acad. Science Paris **150**, 716, 1910.

⁴ J. König und J. Hasenbäumer, Zeitschr. f. Pflanzenernähr. u. Düng. **5**, 497, 1924.

liefern zu können. Nach *Bidler-Chatelan* liegt ein Düngungsbedürfnis für Kali vor, wenn der Boden weniger als 150 mg K_2O im kohlenensäurehaltigen Wasserextrakt aus 1 kg Boden enthält. Von den chemischen Bodenanalysen muß weiter noch die Bestimmung der relativen Citronensäurelöslichkeit nach *Lemmermann*¹ erwähnt werden, welche die Kalibedürftigkeit von Ackerböden auf Grund des Verhältnisses der Kaligehalte im Bodenauszug mit 1%iger Citronensäure und in kalter konzentrierter Salzsäure feststellt.

Die wenigen Erfolge der rein chemischen Bodenanalysen, welche die Bestimmung der assimilierbaren Kalimenge bezweckten, haben die Forschungen auf das pflanzenphysiologische Gebiet hinübergeführt. Die „wurzellöslichen“ Kaliverbindungen, die man zuerst durch Extraktion mit verdünnten Säurelösungen dem Boden zu entnehmen versuchte, wurden mittels wachsenden Pflanzenorganismus dem Boden entzogen und nach kurzer Vegetationsdauer in den Keimpflanzen die Menge des aufgenommenen Kalis festgestellt.

Auf diesem Prinzip ist die Keimpflanzenmethode von *Neubauer*² aufgebaut, welche auf Grund empirisch ermittelten Kaligrenzgehalte in 100 Roggenpflanzen, aufgewachsen während 14 bis 18 Tagen auf 100 g des untersuchten Bodens, die Kalibedürftigkeit desselben für verschiedene Kulturpflanzen qualitativ anzeigt. Die Ergebnisse dieser Methode, welche sonst den praktischen Forderungen eines verhältnismäßig expeditiven Verfahrens schon mehr entspricht, unterliegen nicht nur den natürlichen Schwankungen des Nährstoffgehalts im Boden, welche durch Einwirkung der Witterungsverhältnisse, Pflanzenwachstum und andere herbeigeführt werden, sondern auch denen, welche durch alle in Erwägung kommenden Wachstumsfaktoren (Wärme, Licht, Temperatur usw.) bewirkt werden.

In der gegenwärtigen Arbeit habe ich versucht, die Beziehungen zwischen dem Kaligehalt wässriger Auszüge verschiedenster Böden und der Menge des pflanzenaufnehmbaren Anteils von Bodenkali festzustellen. Das Wasser kommt in erster Reihe in Betracht als natürliches Lösungsmittel der pflanzenzugänglichen Nährstoffsubstanzen im Boden. Die Menge der löslichen Kaliverbindungen, welche sich in den natürlichen Bodenlösungen befindet, ist jedoch sehr gering und unterliegt je nach dem Wassergehalte des Bodens ziemlichen Schwankungen. Zu dem obenerwähnten Zwecke wurde deswegen die Methode der wässrigen Auszüge verwendet, wobei durch Einwirkung eines Wasserüberschusses nicht nur die schon in Lösung begriffenen Kaliverbindungen dem Boden entnommen werden, sondern je nach dem Verhältnis von Wasser zu Bodenmenge noch weitere Anteile löslich werden. Das Ansteigen von löslichem Kaligehalt mit steigender Wassermenge zeigten schon *Dyers*³ Versuche:

¹ O. Lemmermann und Mitarbeiter, Landw. Versuchsstat. 89, 81, 1916.

² H. Neubauer und W. Schneider, Zeitschr. f. Pflanzenernähr. u. Düng. 2, A. 1, 1923.

³ B. Dyer, Journ. of Chem. Soc. 65, 115, 1894.

Verhältnis Boden : Wasser	1 : 2	1 : 4	1 : 10
K ₂ O in mg in kg Boden nach 8 Tagen	35	50	77

Eingehendere Studien über die Beziehungen zwischen der allgemeinen Bodenfruchtbarkeit und dem Gehalt der wässerigen Bodenauszüge an Nitraten, Phosphorsäure und basischen Ionen (Kali, Kalk, Magnesia) wurden von *Burd*¹ ausgeführt. Es hat sich herausgestellt, daß der Gehalt an den erwähnten Nährstoffsubstanzen im Wasserextrakt der Böden die relative Produktionsfähigkeit in annähernder Weise ausdrücken kann. Der Verfasser hat die Hoffnung ausgesprochen, daß es möglich sein wird, innerhalb gewisser Grenzen durch Vergleich ähnlicher Analysen von Böden bekannter Fruchtbarkeit die Ertragsfähigkeit von sonst unbekannten Böden zu beurteilen. Ein solches Verfahren kann aber nicht früher praktisch anwendbar erscheinen, bevor verschiedenste Böden in ihrer Zusammensetzung und Ertragsfähigkeit für verschiedene Kulturpflanzen eingehend studiert werden. Dabei muß auch der Einfluß des Nährstoffentzugs durch wachsende Feldfrüchte und die Schwankungen des wasserlöslichen Nährstoffgehalts während der Wachstumszeit in Betracht gezogen werden. Diesbezüglich wurden weitere Untersuchungen von *Burd* (l. c.) sowie von *Stewart*² eingeleitet. In den Wasserauszügen von bewachsenen und von denselben unbewachsenen Böden konnten wahrnehmbare Unterschiede im Gehalt von Nitratschwefel, Kalk, Kali und Magnesia festgestellt werden, während im Phosphorsäuregehalt keine bedeutenderen Schwankungen auftraten. Die ärmsten Böden zeigten die geringsten Gehalte an wasserlöslichen Nährstoffen und zugleich auch die kleinsten Differenzen zwischen unbewachsenen und bewachsenen Böden. Auffallend bedeutende Unterschiede wurden bei den Untersuchungen verschiedener unbebauter Böden im Gehalt einzelner Nährstoffe wahrgenommen.

Ähnliche Beobachtungen über den Einfluß von Jahreszeit und Nährstoffentzug während des Pflanzenwachstums konnten in der durch die Pflanzen resorbierten Menge an Kaliverbindungen festgestellt werden. *Ludorff*³ untersuchte Bodenproben von demselben Feldstück mit Hilfe der *Neubauerschen* Keimpflanzenmethode je vor und nach der Ernte und fand dabei eine Abnahme an Kaliwerten nach der Ernte von etwa 4 mg K₂O pro 100 g Boden. Auch durch Extraktion mit 1%iger Citronensäure wurde aus denselben Böden nach Abernten der Pflanzen weniger an Kalioxyd gelöst.

Kolorimetrische Kalibestimmung in wässerigen Bodenauszügen.

Zu der Kalibestimmung in wässerigen Bodenextrakten verwendeten *Burd*¹ und *Stewart*² ein Verfahren, welches auf der gewichtsanalytischen Bestimmung von Kaliumplatinchlorid beruht. Das kolorimetrische Verfahren, welches mit kleineren Bodenmengen zu arbeiten erlaubt, stützt sich auf die Reaktion von Platinchloridlösungen mit Zinnchlorür

¹ J. S. Burd, Journ. of Agricult. Research 12, 297, 1918.

² G. R. Stewart, ebendaselbst 12, 311, 1918.

³ W. Ludorff, Landw. Jahrb. 65, 779, 1927.

(Gedroiz¹) in salzsaurer Lösung. Bei den von uns ausgeführten Bestimmungen wurde folgenderweise vorgegangen:

30 g lufttrockenen Bodens wurden mit 100 ccm destillierten, absolut kalifreien Wassers eine halbe Stunde extrahiert, filtriert mit *Schleicher-Schüllschem* Faltenfilter (Nr. 605 hart) und von dem klaren Filtrat 50 ccm in kleine Porzellanschalen abgemessen. Die Flüssigkeit wird mit 3 Tropfen verdünnter Schwefelsäure (1:4) angesäuert und am Wasserbade bis zur Trockene verdampft. Die Porzellanschale mit dem Rückstande wird nun am Asbestnetz unter ständigem Bewegen vorsichtig erwärmt, um den Überschuß von Schwefelsäure abzdampfen, wobei ein Überhitzen tunlichst verhindert werden muß. Hierauf wird der Rückstand auf der Schale über freier Flamme erhitzt, nach Erkalten der Rückstand mehrmals mit kleinen Mengen heißen destillierten Wassers ausgelaugt und durch einen kleinen Tiegel mit poröser Filtrierplatte in eine kleine Porzellanschale filtriert (30 bis 40 ccm). Das Filtrat wird mit 3 bis 4 Tropfen verdünnter Salzsäure (1:1) angesäuert, mit 2 ccm Platinchloridlösung (5 g PtCl_4 in 400 ccm Wasser) versetzt und bis zur Sirupkonsistenz am Wasserbade abgedampft. Dabei darf der Rückstand in der Schale nicht überhitzt werden. Nach Erkalten wird nun der Rückstand mit kleiner Menge 80 %igen Alkohols ausgelaugt, filtriert durch Quarzfiltertiegel und mit Alkohol nachgewaschen (etwa 20 ccm), bis das Filtrat farblos erscheint. Der Niederschlag im Quarzfiltertiegel wird dann durch heißes Wasser gelöst und in einem 100-ccm-Meßkolben gesammelt. Das Volumen des Filtrats wird auf 80 ccm gebracht, von einer Bürette zu der Flüssigkeit genau 3 ccm einer Zinnchlorürlösung in konzentrierter Salzsäure zugesetzt (75 g Zinnchlorür in 400 ccm konzentrierter Salzsäure) und durchgemischt. Nach 20 Minuten wird die nun braun gefärbte Lösung mit destilliertem Wasser bis zur Marke (100 ccm) aufgefüllt und nach weiteren 15 Minuten mit der Standardlösung verglichen.

Als Standardlösung wurde eine Platinchloridlösung verwendet, deren Platingehalt in 50 ccm 1 mg K entspricht (2,4961 mg Pt entsprechen 1 mg K). Von dieser Standardlösung werden 50 ccm in einen 100-ccm-Meßkolben abgemessen, auf 80 ccm mit destilliertem Wasser aufgefüllt und 3 ccm Zinnchlorürlösung in konzentrierter Salzsäure zugesetzt. Nach 20 Minuten wird mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt und zum Vergleich im Kolorimeter verwendet.

Die Standardplatinlösung muß in braun gefärbten Flaschen im Dunkeln aufbewahrt werden und kann, vor Eindringen von Staub und reduzierenden Stoffen geschützt, mehrere Wochen unverändert bleiben. Sämtliche Reagenzien müssen vor der Verwendung auf

¹ K. K. Gedroiz, Chem. Bodenanalyse, S. 186. Borntraeger, 1926.

Reinheit geprüft werden. Es wird empfohlen, mit destilliertem Wasser einen blinden Versuch anzustellen.

Gehalt an wasserlöslichem Kali in den Wasserextrakten und Assimilation der Kaliverbindungen von verschiedenen Böden durch die Pflanze.

Während der Studien über Kalibedürftigkeit verschiedener Böden habe ich versucht, bei einer Reihe von Bodenproben die Beziehungen

Herkunft des Bodens	K ₂ O in mg	
	resorbiert aus 100 g Boden nach Neubauer	in 1000 g Boden kolorimetrisch im Wassereextrakt bestimmt
Bystré	34,96	131,2
Slapanice	30,60	104,4
Zdánice	27,94	84,9
Domašín	27,11	86,7
Hořice	26,90	93,6
Zderaz	25,48	76,5
Chrudim	25,14	78,7
Čáslav	23,12	75,4
Valečov	21,81	80,2
Čáslav	21,47	72,0
Šibřina	21,46	74,0
Svinčany	21,14	82,8
Liblice	19,85	69,8
Unhošt	16,41	63,8
Hospozín	15,05	59,4
Plzeň	13,80	46,1
Čáslav	12,45	47,5
Bilovice	11,73	43,6
Přitočno	11,45	61,9
Vejvanovice	11,29	39,8
Ždár	10,36	51,2
Zvoleněves	10,13	66,9
Světl	9,26	47,4
Rosice	8,97	41,2
Cvrčovice	8,93	47,9
Libějovice	8,88	46,4
oděbrady	8,84	41,5
Vel. Bakta	8,36	39,8
Valečov	7,72	40,7
Roudnice	7,16	38,8
Čáslav	6,80	34,8
Roudnice	5,94	34,6
Holohlavy	5,85	31,6
Suchomasty	5,02	43,2
Přestavlky	4,73	43,1
Netluky	4,73	32,5
Čakovice	4,01	44,6
Hořice	2,51	32,2
Vtelno	1,01	21,2
Filipov	0,63	19,5
Koleč	— 1,16	23,9

zwischen dem relativen Gehalt an wasserlöslichem Kali und der Menge durch die Pflanze aufgenommener Kaliverbindungen zu verfolgen. Die Assimilationsintensität vom Bodenkali wurde mit Hilfe der *Neubauer*-schen Keimpflanzenmethode festgestellt, die gleichzeitig Auskunft über Kalibedürftigkeit des Bodens liefern kann¹. Die Versuche wurden genau nach den Angaben von *Neubauer* angestellt: 100 g Boden wurden mit 50 g Quarzsand gemischt, in kleinen Glasschalen (100 qcm Bodenfläche) mit 250 g Sand überschichtet und mit 100 Roggenkörner besät. Nach 14 Vegetationstagen wurden die Versuche abgebrochen und in der ganzen Pflanzensubstanz (Sprosse und Wurzeln) nach Abspülen von Sand und Boden durch Wasserstrom die Menge des resorbierten Kaliums in der Asche bestimmt. Die Differenz gegenüber den Blindversuchen (in reinem Sande ausgeführt) gibt die Menge des aus dem Boden aufgenommenen Kalis an.

In der vorstehenden Übersichtstabelle sind die Ergebnisse der Versuche, sowie der Gehalt der untersuchten Bodenproben an wasserlöslichem Kali angeführt.

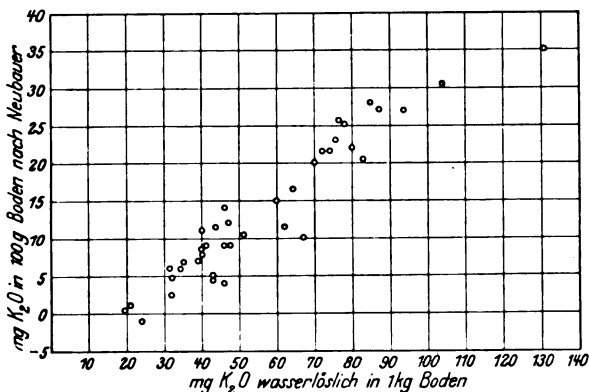


Abb. 1.

Aus der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse ist ersichtlich, daß zwischen der von den Pflanzen aufgenommenen und der im wässrigen Bodenextrakt festgestellten Kalimenge eine annähernde Beziehung besteht. Von den Böden, welche die kalireichsten Wasserextrakte lieferten, wurden die größten Mengen an Kali durch die Roggenkeimpflanzen resorbiert und umgekehrt. Da nach *Neubauer* auf Grund der von den Pflanzen assimilierten Kalimenge auf Kalibedürftigkeit der untersuchten Bodenproben geschlossen werden kann, erscheint es

¹ H. Neubauer und W. Schneider, Zeitschr. f. Pflanzenernähr. u. Düng. 2, A., 1, 1923.

wahrscheinlich, daß auch die einfachere und kürzere Bestimmung des Kaligehaltes in wässerigen Bodenauszügen gewisse Anhaltspunkte für das Beurteilen der Kaliversorgung von Böden liefern könnte. Die Feststellung der allgemein gültigen Grenzwerte für die Beurteilung der Düngungsbedürftigkeit wird jedoch denselben Schwierigkeiten wie bei der *Neubauerschen* Methode begegnen, da die Grenzzahl von dem möglichen Vollertrag, dessen Größe man nicht bestimmt kennt, sondern nur voraussetzt, abhängig ist¹. Die Bestimmung kann aber einen vergleichbaren Maßstab für die aufnehmbaren Kalimengen liefern, welcher erlaubt, die reich versorgten von den kaliarmen Böden qualitativ abzutrennen.

¹ *H. Wiesmann*, Zeitschr. f. Pflanzenernähr., Düng. u. Bodenkunde **6**, B., 68, 1927.

Über den Stoffwechsel der Netzhaut.

Von

Hans Adolf Krebs.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Abt. Warburg, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 22. Juli 1927.)

Nach früheren Versuchen aus diesem Institut zeichnet sich die Netzhaut durch einen besonders großen Spaltungsstoffwechsel aus¹. Die überlebende Rattenetzhaut bildet anaerob pro Stunde 30 bis 35 % ihres Trockengewichts an Milchsäure, aerob 12 bis 16 %. Ich habe mich mit dem Stoffwechsel der Vogelnethaut beschäftigt und gefunden, daß die Netzhaut des Huhnes anaerob pro Stunde bis zu 55 % Milchsäure ihres Trockengewichts an Milchsäure bildet, die Netzhaut der Taube sogar bis zu 84 %. Der Spaltungsstoffwechsel der Vogelretina ist also weitaus größer als der Spaltungsstoffwechsel der Rattenetzhaut.

Weiterhin hat sich gezeigt, daß die überlebende Vogelnethaut nicht atmet oder nur so wenig, daß ihr Oxydationsstoffwechsel gegenüber dem Spaltungsstoffwechsel verschwindet. Will man nicht annehmen, daß der Oxydationsstoffwechsel der Vogelnethaut beim Herauspräparieren aus dem Körper vernichtet wird — was unwahrscheinlich ist² — so folgt aus meinen Versuchen, daß die Vogelretina auf Kosten des Spaltungsstoffwechsels lebt.

I. Methode.

Die Versuchstiere werden durch Halsdurchschneiden getötet. Gleich nach dem Tode wurde der Bulbus enukleiert, am Äquator aufgeschnitten und in körperwarmes, mit 5 Vol.-% Kohlensäure ge-

¹ O. Warburg, K. Posener und E. Negelein, diese Zeitschr. 152, 333, 1924.

² Im Gegensatz zu einer früher von mir geäußerten Vermutung (diese Zeitschr. 152, 333, 1924) ist dies nunmehr auch für die Rattenretina unwahrscheinlich. Warburg.

sättigtes Tauben- oder Hühnerserum eingetaucht. Die Netzhaut ließ sich von der Pigmentschicht und vom Glaskörper leicht abstreifen. Für die Stoffwechselmessung benutzte ich von der Netzhaut (die in toto etwa 8 mg wiegt) ein kleines Stück von etwa 0,5 bis 1,5 mg Trockengewicht. Das Präparieren geschah bei schwachem künstlichen Licht.

Der Stoffwechsel wurde mit den früher beschriebenen manometrischen Methoden¹ in Tauben- oder Hühnerserum im Dunkeln gemessen. In Ringerlösung und in inaktiviertem Pferdeserum waren die Stoffwechselgrößen kleiner als in Vogelserum. In Taubenserum und Hühnerserum war dagegen der Stoffwechsel der Taubenretina gleich. —

Will man neben einer großen Gärung eine kleine Atmung messen, so ist das sicherste Verfahren ein Vergleich der Druckänderungen in Sauerstoff und in Stickstoff. Ist eine Atmung vorhanden, so ist der in Stickstoff gemessene positive Druck größer als der in Sauerstoff gemessene Druck, sowohl wegen der Atmung (die immer negative Drucke erzeugt) als auch wegen der Wirkung der Atmung auf die Gärung.

II. Ergebnisse.

Die Tabelle enthält die Ergebnisse von 5 Versuchen. Ein ausführliches Protokoll findet man in Abschnitt IV. Sowohl $Q_M^{N_2}$ als auch $Q_M^{O_2}$ wurden durch Multiplikation der in Sauerstoff beobachteten Druckänderung (pro Milligramm und Stunde) mit der „Gefäßkonstanten für Milchsäure“ erhalten.

Tabelle.

Stoffwechsel der Hühner- und Taubennetzhaut (40°).

Material	Medium	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$
Hühnernetzhaut	Hühnerserum	+ 134	+ 137
"	"	+ 82,5	+ 77
Taubennetzhaut	Taubenserum	+ 169	+ 162
"	Hühnerserum	+ 184	+ 191
"	"	+ 198	+ 209

Aus den Versuchen geht folgendes hervor:

1. $Q_M^{O_2}$ und $Q_M^{N_2}$ sind in allen Versuchen innerhalb der Meßgenauigkeit gleich. Die Atmung ist also Null oder sehr klein.

2. Die Q_M -Werte liegen beim Huhn zwischen + 77 und + 137, bei der Taube zwischen + 162 und + 209, Schwankungen, die nicht durch die Methode, sondern durch individuelle Unterschiede der Netzhäute bedingt sind. Die Gärung der Vogelnethaut ist die größte Gärung, die für tierische Gewebe gefunden ist.

¹ O. Warburg, Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926.

III. Stoffwechsel der embryonalen Hühnernetzhaut.

Die Netzhaut eines 16 Tage alten Hühnerembryos ergab folgende Stoffwechselquotienten (Protokoll 2):

$$Q_{O_2} - 10,6 \quad Q_M^{O_2} + 33 \quad Q_M^{N_2} + 54 \quad \text{Meyerhof-Quotient } 2,0.$$

Danach besitzt die Netzhaut des Hühnerembryos im Gegensatz zur Netzhaut des erwachsenen Huhnes eine beträchtliche Atmung.

IV. Protokolle.

1. Stoffwechsel der Taubenretina in Hühnerserum (40°).

	Gefäß I*	Gefäß II*
Gasraum	5 Vol.-% CO ₂ in O ₂	5 Vol.-% CO ₂ in N ₂
Volumina in ccm	$v_G = 3,77 \quad v_F = 4$	$v_G = 3,71 \quad v_F = 4$
Gefäßkonstanten in qmm	$k_{CO_2}^{Ringer} = 0,532$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0,090$ $k_M^{Serum} = 0,892$	$k_{CO_2}^{Ringer} = 0,527$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0,090$ $k_M^{Serum} = 0,887$
Trockengewicht der Netzhaut	0,40 mg	1,35 mg
Druckänderungen in 15' in mm	+ 44,5 $Q_M^{O_2} = + 198$	+ 79,5 $Q_M^{N_2} = + 209$

* Form der Gefäße: siehe O. Warburg, Über den Stoffwechsel der Tumoren, S. 108, Abb. 1. Das Gesamtvolumen eines Gefäßes betrug etwa 8 ccm.

2. Stoffwechsel der embryonalen Hühnerretina in Hühnerserum. (16 Tage alter Hühnerembryo.) 40°.

	Gefäß I	Gefäß II
Volumina in ccm	$v_G = 6,91 \quad v_F = 1$	$v_G = 4,21 \quad v_F = 3,5$
Gefäßkonstanten in qmm	$k_{O_2} = 0,605 \quad k_{CO_2}^{Ringer} = 0,654$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0,137$ $k_M^{Serum} = 0,791$	$K_{O_2} = 0,374 \quad K_{CO_2}^{Ringer} = 0,545$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0,092$ $K_M^{Serum} = 0,867$
Trockengewicht d. Netzhaut	0,81 mg	2,25 mg
Gasraum	5 Vol.-% CO ₂ in O ₂	5 Vol.-% CO ₂ in O ₂
Druckänderungen in 30' in mm	+ 15,5	+ 25,5
Gasraum	5 Vol.-% CO ₂ in N ₂	5 Vol.-% CO ₂ in N ₂
Druckänderungen in 15' in mm	+ 14	+ 34,5
Stoffwechselquotienten	$Q_{O_2} = - 10,6 \quad Q_S^{O_2} = + 43,8 \quad Q_M^{O_2} = + 33 \quad Q_M^{N_2} = + 54$ Meyerhofquotient $\left(\frac{Q_M^{N_2} - Q_M^{O_2}}{Q_{O_2}}\right) = 2,0$	

Über die quantitative Bestimmung des Carnosins.

Von

Franz Meinrad Kuen.

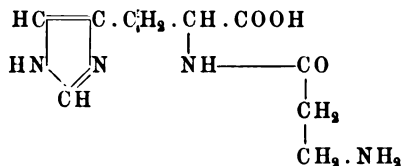
(Aus der Abteilung für physiologische Chemie im Wiener Physiologischen Universitätsinstitut.)

(Eingegangen am 23. Juli 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Das Carnosin stellt bekanntlich einen der Hauptbestandteile des Muskels dar, welcher sich in weiter Verbreitung bei den meisten Wirbeltieren findet. Es fehlt nur bei manchen Fischen (Anacanthinen wie *Gadus* und *Solea*) und bei Wirbellosen.

Die Konstitution des Carnosins ist bereits als β -Alanylhistidin definitiv festgestellt. *Barger*¹ schreibt ihm folgende Konstitution zu:



Das Carnosin ist eine sehr labile Substanz. In frischen Muskeln ist viel mehr davon gefunden worden als in Gefrierfleisch. Die Muskeln scheinen ein Agens zu enthalten, durch welches die Zerstörung des Carnosins katalytisch beschleunigt wird.

O. Fürth und seine Mitarbeiter haben die Menge desselben in 1 kg frischen Fleisches auf 2 bis 3 g veranschlagt, wobei sie dasselbe nach zweierlei kolorimetrischen Methoden auswerteten. Die eine Methode beruht darauf, daß das Carnosin durch Kochen mit Kupferhydroxyd in eine schön violette, gut kristallisierende Kupferverbindung übergeführt und die Färbung der Lösung mit einer Standardlösung von Carnosinkupfer verglichen worden ist. Die andere Methode beruht auf einer Farbenreaktion der Histidinkomponente mit Diazobenzolsulfosäure.

¹ *G. Barger* und *F. Tutin*, *Biochem. Journ.* **12**, 1918.

Da neuere auf dem letzteren Prinzip beruhende Beobachtungen von *W. Mary Clifford* vielfach Werte ergeben haben, die diejenigen des *Fürth'schen* Laboratoriums ganz erheblich übertreffen, erschien eine neue Untersuchung des Gegenstandes geboten.

Es war dies um so mehr der Fall, als neuere Untersuchungen von *R. Krimberg* die physiologische Bedeutung des Carnosins von neuen Gesichtspunkten aus erscheinen lassen. Bekanntlich wirkt Fleisch-extrakt sehr kräftig erregend auf die Sekretion des Magen- und Darm-saftes, und es erscheint wahrscheinlich, daß diese Wirkung mit dem Carnosin in engem Zusammenhang steht. Nach neuen Untersuchungen muß es allerdings fraglich erscheinen, ob diese Wirkung dem reinen unveränderten Carnosin eigentümlich sei, oder ob sie nicht vielmehr irgend einem Umwandlungsprodukt desselben zugeschrieben werden müsse.

Wir haben die Bestimmung des Carnosins nach verschiedenen Verfahren versucht. 1. Gravimetrisch nach einem vereinfachten und modifizierten Verfahren als *Carnosinkupfer*. 2. Durch gravimetrische Bestimmung des aus dem Carnosin durch Hydrolyse abgespaltenen *Histidins* als *Pikrolonat*. 3. Auf dem Wege der *Diazokolorimetrie*, einerseits durch Kolorimetrie der Histidinkomponente, andererseits durch direkte Kolorimetrie des Carnosins. 4. Auf dem Wege direkter *Kupferkolorimetrie*.

Ich gehe nunmehr zur Beschreibung der einzelnen Methoden über.

I. Bestimmung des Carnosins als Carnosinkupfer.

Gulewitsch, der Entdecker des Carnosins, hat zuerst die wichtigsten Eigenschaften des Carnosinkupfers beschrieben¹ und darauf hingewiesen, daß es infolge seiner Schwerlöslichkeit in Wasser und seiner höchst charakteristischen hexagonalen, tiefblau gefärbten Kristalle zum Nachweis und zur Identifizierung des Carnosins sehr geeignet ist. Zur Isolierung des Carnosins empfahl *Gulewitsch* das Carnosinkupfer jedoch nicht, da der Löslichkeitsunterschied in kaltem und heißem Wasser nicht genügend groß sei, um eine befriedigende Reinigung desselben durch Umkristallisieren zu ermöglichen.

Später hat *M. Mauthner*² im *Fürth'schen* Laboratorium versucht, das Carnosin in Form seiner Kupferverbindung abzuscheiden: Sie fällt den durch Auskochen hergestellten wässerigen Fleischextrakt zuerst mit Bleiacetat, dann mit Phosphorwolframsäure. Der letztere Niederschlag wurde mit Baryt zerlegt und die Flüssigkeit nach Entfernen des Bariums mit Kupferhydroxyd gekocht, filtriert und eingeengt. Auf diese Weise erhielt sie aus je 1 kg Pferdefleisch einmal 1 g, ein zweites Mal 0,58 g Carnosinkupfer. Bei drei weiteren Versuchen mit Pferdefleisch konnte sie jedoch kein Carnosinkupfer isolieren. Ebenso gelang es nicht, aus *Liebigschem*

¹ *Gulewitsch*, Zeitschr. f. phys. Chem. **30**, 565.

² *M. Mauthner*, Monatsh. f. Chem. **34**, 269, 1913.

Fleischextrakt Carnosinkupfer abzuscheiden, wobei besonders auffiel, daß das Lösungsvermögen der Carnosinfraktion für Kupferhydroxyd ihrem Stickstoffgehalt gar nicht proportional erschien, was *M. Mauthner* zu der Vermutung führte, daß das Carnosin in den Carnosinfraktionen vielleicht als Anhydrid vorhanden war.

Bedeutend höhere Ausbeuten erhielten *Fürth* und *Hryntschak*¹ nach folgendem Vorgang: Der wässrige Auszug wurde mit barytalkalischer Silbernitratlösung gefällt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde wie gewöhnlich mit Baryt zerlegt und die so erhaltene Carnosinfraktion möglichst kurz (1 bis 2 Minuten) mit Kupferhydroxyd gekocht und die Carnosinkupferlösung im Vakuum oder im *Fausts*chen Apparat zur Kristallisation gebracht.

Dabei ergaben sich folgende Carnosinwerte: 1 kg Fleisch ergab 1,60, 1,77, 1,42, 1,88 g Carnosin.

Vergleicht man diese Werte mit jenen, die man durch Kolorimetrie erhält, so ergibt sich, daß nur ungefähr die Hälfte bis zwei Drittel des kolorimetrisch bestimmten Carnosingehalts zur Abscheidung gelangt waren.

In einem einzigen Versuch ist es *Fürth* und *Hryntschak* gelungen, aus einer Carnosinfraktion annähernd die ganze darin kolorimetrisch ausgewertete Carnosinmenge als Carnosinkupfer zu gewinnen. Die Ausbeute an Carnosinkupfer entsprach einem Carnosingehalt von 2,60 g pro 1 kg Fleisch. Die kolorimetrische Bestimmung ergab 2,98 g Carnosin pro 1 kg Fleisch.

Vorversuche.

Versuch 1. Der durch Auskochen von 250 g Pferdefleisch hergestellte Extrakt wurde mit Bleiacetat und Natriumphosphat gefällt, das Filtrat mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag mit Baryt zerlegt und nach Entfernung des Bariums die Carnosinfraktion mit Kupferhydroxyd gekocht. Das blaue Filtrat wurde im *Fausts*chen Apparat eingeeengt, wobei sechseckige Kristalle erschienen. Die Ausbeute betrug 0,4 g. Diese Menge entspricht einem Carnosingehalt von 1,2 g pro 1 kg Fleisch.

Versuch 2. Der wässrige Auszug aus 1 kg Pferdefleisch wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt und der Niederschlag wie gewöhnlich mit Baryt zerlegt. Die eingeeengte Carnosinfraktion wurde mit frisch gefälltem Kupferhydroxyd in der Kälte geschüttelt, wobei Lösung eintrat. Beim Einengen des Filtrats im *Fausts*chen Apparat ergab sich eine Ausbeute an Carnosinkupfer von 3,00 g (entspricht einem Carnosingehalt von 2,25 g).

Versuch 3. Der Extrakt aus 500 g Pferdefleisch wurde, wie in Versuch 2, mit Phosphorwolframsäure gefällt und ebenso weiterbehandelt. Die Ausbeute an Carnosinkupfer betrug 1,6 g (entspricht einem Carnosingehalt von 2,4 g pro Kilogramm Fleisch).

Versuch 4. Ebenso wie Versuch 2 und 3. Ausbeute an Carnosinkupfer 1,5 g (entspricht einem Carnosingehalt von 2,25 g pro Kilogramm Fleisch).

Versuch 5. Der Extrakt aus 250 g Pferdefleisch wurde mit Bleiacetat und Natriumphosphat gefällt, das Filtrat wurde mit Quecksilbersulfat gefällt. Nach Entfernung des Quecksilbers mit Schwefelwasserstoff und der Schwefelsäure mit Baryt wurde die Carnosinfraktion mit Kupfer-

¹ *O. Fürth* und *Hryntschak*, diese Zeitschr. 64, 172, 1914.

hydroxyd gekocht und die blaue Lösung im *Fausts*chen Apparat eingengt. Die Menge an Carnosinkupfer betrug 0,3 g.

Versuch 6. 500 g Kaninchenfleisch wurden ebenso behandelt wie in Versuch 5. Beim Schütteln der Carnosinfraktion mit Kupferhydroxyd in der Kälte trat nur *schwache* Blaufärbung ein. Durch Kochen konnte die Blaufärbung nicht verstärkt werden. Aus der schwach blauen Lösung konnten keine Kristalle von Carnosinkupfer erhalten werden.

Versuch 7. 10 g *Liebigs*chen Fleischextrakts wurden, wie in Versuch 5 und 6, zuerst mit Bleiacetat und Natriumphosphat, dann mit Quecksilbersulfat gefällt. Die Carnosinfraktion löste in der Kälte kein Kupferhydroxyd, sondern erst beim Kochen. Die blaue Lösung wurde mit Aceton versetzt, wobei ein unreiner blauer Niederschlag ausfiel. Beim Umkristallisieren desselben aus 10%igem Ammoniak wurden nicht die typischen Kristalle des Carnosinkupfers erhalten.

Versuch 8. 40 g *Liebigs*chen Fleischextrakts wurden auf dieselbe Weise verarbeitet und gaben wohl eine blaue Lösung, aber keine Kristalle von Carnosinkupfer.

Die Ergebnisse anderer Autoren auf diesem Gebiete sowie unsere eigenen Versuche zeigen, daß man, um zu einer befriedigenden Bestimmung des Carnosins in der Form seiner Kupferverbindung zu gelangen, besonders folgende Umstände berücksichtigen muß.

1. Das Auskochen des Fleisches führt zur Bildung von albumose-ähnlichen Produkten, welche man vor der eigentlichen Carnosinfällung entfernen muß. Um die Verluste bei mehrfachem Fällen zu umgehen, empfiehlt es sich, den Auszug nicht durch Kochen, sondern durch Erhitzen der Lösung *bis zu einer Temperatur von höchstens 70°* herzustellen. Der so erhaltene Extrakt gibt mit Bleiacetat und Natriumphosphat fast gar keinen Niederschlag, so daß unmittelbar das Carnosin gefällt werden kann.

2. Nach den Untersuchungen von *Smorodinzew* hat sich herausgestellt, daß die Phosphorwolframsäure das Carnosin oft *nicht vollständig* fällt. Die Fällung wird besonders durch *Gegenwart von Acetaten beeinträchtigt*. So ergab z. B. die Fällung ein und desselben Fleischextraktes mit verschiedenen Fällungsmitteln folgende Resultate.

Fällung mit:

Bleiacetat, Phosphorwolframsäure	0,311 %	Carnosin
Phosphorwolframsäure	0,298 %	„
Bleiacetat, Quecksilbersulfat	0,318 %	„
Bleiacetat, Phosphorwolframsäure in schwefelsaurer Lösung	0,133 %	„

Die Versuche zeigen, daß bei Ausführung der Phosphorwolframsäurefällung in schwefelsaurer Lösung die Gegenwart von Acetat die Fällung beeinträchtigt¹.

¹ *Smorodinzew*, Zeitschr. f. phys. Chem. **92**, 213.

In einer zweiten Arbeit¹ hat *Smorodinzew* gezeigt, daß das *Quecksilbersulfat* der Phosphorwolframsäure zur Fällung des Carnosins vorzuziehen ist, da es nur das Carnosin selbst und die Purine fällt. Die Phosphorwolframsäure dagegen fällt außerdem noch das Kreatin und Carnitin und andere Basen. So enthielt z. B. ein mit Quecksilbersulfat hergestellter Niederschlag 0,115 % Carnosin und 0,058 % Purine. Dagegen enthielt ein aus demselben Fleischextrakt mit Phosphorwolframsäure gefällter Niederschlag 0,076 % Carnosin, 0,038 % Purine, 0,042 % Carnitin und 0,173 % Kreatin.

Das *Quecksilbersulfat* fällt das Carnosin als äußerst schwer lösliche Verbindung, so daß im Filtrat des Niederschlags das Carnosin mit Hilfe der Diazoreaktion nicht mehr nachzuweisen ist. Wir haben also bei den weiteren Versuchen das *Quecksilbersulfat* an Stelle der Phosphorwolframsäure verwendet.

3. Die Zersetzung des Carnosinkupfers sowohl beim Kochen der Carnosinfraction mit Kupferhydroxyd als auch beim Einengen der Carnosinkupferlösung konnte vollständig vermieden werden. Die Carnosinfractionen lösen nämlich *bereits in der Kälte* Kupferhydroxyd bei energischem Schütteln. Zur Abscheidung des Carnosinkupfers vermieden wir jede Einengung der Lösung. Wir fällten dasselbe durch Zusatz von *Aceton*, in dem es sehr schwer löslich ist. Auf diese Weise gelingt es, das ganze Carnosin als Carnosinkupfer abzuscheiden.

Ausführung der Bestimmung.

Das frische, von Bindegewebe und Fett befreite Fleisch wird durch die Fleischhackmaschine getrieben, gewogen und dreimal mit Wasser bei einer 70° nicht übersteigenden Temperatur extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden nach Zusatz von einigen Tropfen 10 %iger Essigsäure bis zur Lackmusrötung am Wasserbad stark eingeeengt. Die geringen Mengen des dabei sich abscheidenden flockigen Niederschlags werden filtriert und das Filter mit heißem Wasser gut nachgewaschen². Das klare Filtrat wird mit Alkohol so lange versetzt, bis eine ganz schwache Trübung entsteht, und hierauf Äther zugefügt, bis eine Probe nach Zusatz von *Hopkins Reagens* einen sich sofort gut absetzenden Niederschlag gibt³. Dann wird mit Hopkins Reagens vorsichtig gefällt, wobei man jeden größeren Überschuß wegen der lösenden Wirkung vermeidet. Nach 24stündigem Stehen wird der Niederschlag abgenutscht, am Filter gründlich mit einer Mischung von 120 ccm Alkohol, 50 ccm 10 %iger Schwefelsäure und 30 ccm Äther, dann mit Alkohol und Äther

¹ *Smorodinzew*, Zeitschr. f. phys. Chem. **92**, 221.

² Bis zum Verschwinden der Diazoreaktion.

³ Die Fällung in alkoholisch-ätherischer Lösung wurde zuerst von *M. Dietrich* angegeben (Zeitschr. f. phys. Chem. **92**, 212, 1914). *Darstellung des Hopkinsreagens*: Zu 100 g Mercurisulfat wird langsam unter Rühren in kleinen Portionen 1 Liter 5 %iger Schwefelsäure zugefügt und von dem ungelösten basischen Sulfat abfiltriert.

nachgewaschen und trocken gesaugt. Der vollständig trockene Niederschlag wird nach Entfernung vom Filter fein zerrieben und in Wasser suspendiert. Nach Zusatz von wenig verdünnter Schwefelsäure wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Man fügt dann so lange Barytwasser hinzu, bis die Reaktion schwach alkalisch ist und der Niederschlag von Quecksilbersulfid und Bariumsulfat sich gut absetzt, und filtriert. Das Filtrat wird mit Kohlensäure vom Baryt befreit, am Wasserbad stark eingeeengt und filtriert. Die klare Flüssigkeit wird dann mit so viel Wasser versetzt, daß 1 ccm derselben 1 g Fleisch entspricht. Man versetzt nun die Carnosinfraktion mit frisch gefälltem Kupferhydroxyd¹ und schüttelt im Schüttelapparat ungefähr 20 Minuten. Dabei muß ein Teil des Kupferhydroxyds ungelöst bleiben, oder es muß noch solches zugefügt werden. Das überschüssige Kupferhydroxyd wird durch Zentrifugieren entfernt und die tiefblaue Carnosinkupferlösung so lange mit Aceton versetzt, bis eine schwache Trübung entsteht. Nach 24 Stunden wird das Carnosinkupfer, welches meist noch nicht rein, sondern flockig ausgefallen ist, auf einem Goochtiigel aus Jenaer Glas gesammelt. Das Filtrat soll farblos oder nur ganz schwach blau gefärbt sein. Ist es stärker blau gefärbt, so muß die Fällung durch Zusatz von mehr Aceton beendet werden. Das Carnosinkupfer wird im Tiegel in 10 %igem Ammoniak gelöst und die Lösung durch den Goochtiigel in eine Kristallisierschale gesaugt. Dabei bleiben Verunreinigungen ungelöst. Die Lösung wird im Vakuum eingeeengt oder das Ammoniak an der Luft entweichen gelassen. Dabei kristallisiert das Carnosinkupfer in Form von sechseckigen Tafeln oder kugeligen Aggregaten. Das so gereinigte Carnosinkupfer wird auf einen gewogenen

Gef.: 21,1, 20,43 %; Ber.: 20,8 %.

Nach diesem Verfahren ergaben sich folgende Carnosinwerte:

Rind	0,313 %	Carnosin
„	0,308 %	„
Pferd	0,320 %	„
„	0,292 %	„
„	0,289 %	„
„	0,263 %	„
„	0,383 %	„
„	0,307 %	„
Rind (Gefrierfleisch)	0,127 %	„
Schwein (geräuchert)	0,0 %	
Brasse	0,088 %	„
Kabeljau	0,0 %	
Kaninchen	0,066 %	„

¹ Darstellung des Kupferhydroxyds: 40 ccm 10 %ige Kupfersulfatlösung werden mit 13 ccm 10 %iger Natronlauge versetzt und die Mischung mit 2 Liter Wasser verdünnt. Nach dem Absetzen dekantiert man, fügt wieder 2 Liter Wasser zu, läßt absetzen und nutsch den Niederschlag ab.

Goochtiiegel gebracht und im Vakuum bei 100° über Chlorcalcium bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

So hergestelltes Carnosinkupfer ist vollständig rein. Die Kupferbestimmung ergab vorstehende Werte.

Bei Parallelbestimmungen aus ein und demselben Fleisch ergab sich folgende Übereinstimmung: 0,289 %, 0,292 %, 0,279 %.

II. Bestimmung des aus dem Carnosin abgespaltenen Histidins als Pikrolonat.

Hydrolysiert man das Carnosin, so kann man das abgespaltene Histidin als schwer lösliches Monopikrolonat fällen. Die Carnosinfraction wurde, wie oben unter I beschrieben, durch Fällung mit Hopkins Reagens dargestellt. Der Niederschlag von Quecksilbersulfid und Bariumsulfat filtriert und das Filtrat mit verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuert. Nach dem Filtrieren wird auf ein kleineres Volumen eingengt und nach Zusatz von konzentrierter Salzsäure 5 Stunden hydrolysiert. Zur Entfernung der Salzsäure dampft man im Vakuum am Wasserbad vollständig ein. Der Rückstand wird in Wasser gelöst, filtriert und mit der dem Stickstoffgehalt entsprechenden Menge Pikrolonsäure (in alkoholischer Lösung) versetzt und der Alkohol am Wasserbad verjagt. Die abgeschiedenen Kristalle werden auf einem Glasgoochtiiegel gesammelt und bei 100° getrocknet. Nach diesem Verfahren wurden folgende Werte auf Carnosin umgerechnet erhalten.

Rind	0,314 %	Carnosin
Pferd	0,345 %	„
„	0,289 %	„
„	0,285 %	„
„	0,296 %	„

Nach *M. Mauthner* (l. c.) kann man die Carnosinfraction auch direkt mit Pikrolonsäure fällen. Dabei soll sich das Natriumsalz des Carnosin-Dipikrolonates, $C_{29}H_{29}N_{12}O_{13}Na$, abscheiden, und zwar gingen 80 bis 90 % des Stickstoffs der Carnosinfraction in diese Verbindung über, doch gibt *M. Mauthner* nicht den Carnosingehalt, auf Fleisch berechnet, an.

III. Die kolorimetrische Bestimmung des Carnosins mit Hilfe der Diazoreaktion.

Die von *Pauly*¹ entdeckte Diazoreaktion des Histidins wurde zuerst von *Weiss* und *Ssobilew*² im Fürth'schen Laboratorium zu einer

¹ *Pauly*, Zeitschr. f. phys. Chem. 42, 508.

² *Weiss* und *Ssobilew*, diese Zeitschr. 58, 119, 1913.

quantitativen Bestimmungsmethode verwendet. Später haben *Hanke* und *Koessler*¹ die Diazoreaktion zu einer exakten Mikrobestimmung für Imidazol und seine Derivate ausgearbeitet. Das Carnosin selbst mit Hilfe der Diazoreaktion zu bestimmen, hat zuerst *Mary Clifford* versucht². *Koessler* und *Hanke* beobachteten eine strenge Proportionalität zwischen der vorhandenen Imidazolmenge und der entwickelten Farbintensität. Im Gegensatz zu diesen Autoren konnte *Clifford* keine Proportionalität feststellen.

Der Vorgang *Cliffords* ist folgender: Das Fleisch wird nur einmal mit Wasser bei 60 bis 90° extrahiert. Der Extrakt wird mit Metaphosphorsäure gefällt und im Filtrat die Diazoreaktion nach *Hanke-Koessler* angestellt; die gebildete Farbe wird mit dem Standard verglichen. Die zur Reaktion verwendete Menge der Carnosinfraction wird so lange variiert, bis Farbengleichheit eintritt. *Clifford* hat nun nach diesem Verfahren eine große Anzahl von Tieren untersucht und kommt zu folgenden Ergebnissen:

Das Carnosin ist abwesend bei den Invertebraten. Unter den Wirbeltieren fehlt es nur bei den Anacanthinen. Bei den Acanthopteren und Physostomen findet es sich in Beträgen von 0,11 bis 0,50 %. Bei Reptilien und Amphibien schwankt der Carnosingehalt zwischen 0,06 bis 0,32 %, bei Vögeln von 0 bis 0,18 % und bei Säugern zwischen 0,05 bis 1,12 %. Bei den einzelnen Arten fand sie folgende Werte:

Kaninchen	0,13 bis 0,16 %
Ratte	0,10 „ 0,125 %
Rind	0,98 „ 1,12 %
Schaf	0,37 „ 0,42 %
Pferd	0,90 %

Aus diesen Zahlen schließt *Clifford*, daß in jeder Spezies der Carnosin-gehalt konstant sei.

Fast gleichzeitig mit den Arbeiten von *Clifford* erschienen die Untersuchungen von *G. Hunter*³, welche zu wesentlich anderen Ergebnissen führten. *Hunter* konnte bei wiederholten Bestimmungen, sowohl bei Histidin als auch bei Carnosin, die vollständige Proportionalität der Diazofärbung feststellen und so die Ergebnisse von *Hanke* und *Koessler* bestätigen.

Hunter empfiehlt folgenden Vorgang zur Bestimmung des Carnosins: Das Fleisch wird dreimal bei 70° extrahiert, das Eiweiß nach dem Ansäuern mit Essigsäure bei 70° gefällt und der Niederschlag über Glaswolle filtriert. Das so erhaltene Filtrat ist klar und gibt keine Eiweißreaktionen. In dieser Lösung wird nun die Diazoreaktion nach *Hanke-Koessler* angestellt. Als Standard für Carnosin gibt *Hunter* folgende Lösung an: 0,10 ccm einer 0,1 %igen MethylorangeLösung plus 0,25 ccm einer 0,5 %igen Kongorotlösung werden mit Wasser auf 100 ccm verdünnt. Die Bestimmung des

¹ *M. T. Hanke* und *K. Koessler*, Journ. of Biol. Chem. **89**, 497, 522; **48**, 527, 543.

² *M. Clifford*, Biochem. Journ. **15**, 400, 1921; **15**, 725, 1921; **16**, 341, 1922.

³ *G. Hunter*, ebendasselbst **15**, 689, 1921; **16**, 640, 1922.

molekularen Farbenwertes ergab für Histidin 117 000 000 mm (nach *Hanke-Koessler* 114 000 000 mm), für Carnosin 152 000 000 mm.

In der zweiten Arbeit hat *Hunter* die Verteilung des Diazofarbstoffs auf verschiedene Fraktionen untersucht. Der Hauptteil des Farbstoffs wird von der Carnosinfraktion gebildet.

Die Purine beteiligen sich mit 3% an der Gesamtfarbindensität. Weitere 2% des Farbstoffs werden ebenfalls nicht von Carnosin, sondern von anderen Stoffen gebildet.

Hunter hat ferner mit Hilfe der modifizierten *Knoopschen* Probe die Gegenwart von Histidin in manchen Fleischproben festgestellt, besonders in solchen, die bereits beginnende Fäulnis zeigten.

Im Gegensatz zu *Clifford* hat *Hunter* keine Konstanz des Carnosin-gehalts innerhalb ein und derselben Spezies gefunden, wie die folgende Übersicht zeigt:

Kaninchen	0,026	0,064	0,090	0,100 %	Carnosin
Ochse	0,340	0,400	0,515	0,640 %	„
Katze	0,123	0,203	0,336	0,380 %	„
Frosch	0,107	0,128	0,142	0,280 %	„

Die Widersprüche zwischen *Clifford* und *Hunter*, insbesondere die extrem hohen Werte, welche *Clifford* von Rinder- und Pferd Muskeln angibt, welche mehr als dreimal so groß sind, als die im hiesigen Institut bestimmten, haben uns veranlaßt, auch die diazokolorimetrische Carnosinbestimmung zu untersuchen.

Eigene Versuche.

Proportionalität des Diazofarbstoffs.

Um uns von der Proportionalität des gebildeten Diazofarbstoffes zu überzeugen, stellten wir folgenden Versuch an. 0,0100 g reinsten Histidindichlorids von *Schuchardt* wurden in 100 ccm Wasser gelöst. 1 ccm der Lösung entsprach 0,0001 g Histidindichlorid. Die Diazoreaktion wurde genau nach den Angaben von *Hanke* und *Koessler* durchgeführt. Die Resultate sind im folgenden Diagramm dargestellt:

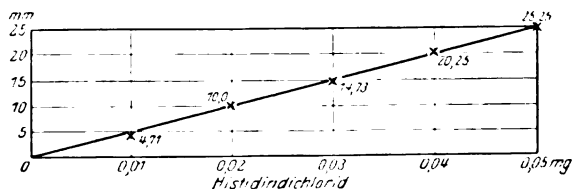


Abb. 1.

Für das Histidin ergab sich also die beste Bestätigung der Angaben von *Hanke* und *Koessler*. 0,02 mg Histidindichlorid entsprach

am Kolorimeter einer Ablesung von 10,00 mm. Daraus ergibt sich folgender molekulare Farbenwert:

$$\frac{10,00}{2} \times 228 \times 10^5 = 114\,000\,000 \text{ mm.}$$

(*Hanke-Koessler*: 114 000 000 mm, *Hunter*: 117 000 000 mm).

Um das Verhalten des Carnosins zur Diazoreaktion zu untersuchen, stellten wir eine ungefähr 1 %ige Carnosinlösung her. 3,1033 g reiner, wiederholt aus verdünntem Ammoniak umkristallisierter Carnosinkupferkristalle (Kupfergehalt 21,10 %, berechnet 20,80 %), welche im Vakuum bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet worden waren, wurden fein gepulvert und in schwach schwefelsaurer Lösung mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Kupfersulfid wurde abfiltriert, am Filter mit heißem Wasser gewaschen und das klare Filtrat nach dem Neutralisieren auf ein Volumen von 200 ccm gebracht. Diese Carnosinlösung wurde unter einer Schicht von Toluol aufbewahrt. Aus der Stickstoffbestimmung nach *Kjeldahl* berechnet, ergab sich ein Carnosingehalt von 1,151 %, aus der Carnosinkupfermenge von 3,1033 g berechnet sich ein Carnosingehalt von 1,148 %. Es zeigte sich also völlige Übereinstimmung des erhaltenen Wertes mit dem berechneten. Mit dieser Lösung stellten wir nun die Diazoreaktion ebenso wie beim Histidin an, und zwar in einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,1 mg Carnosin. Als Standard verwendeten wir den von *Hunter* angegebenen (1,25 ccm Kongorot + 0,5 ccm Methylorange, 500 ccm Wasser), welcher sich mit dem mehr roten Diazofarbstoff des Carnosins sehr gut vergleichen läßt. Unsere Versuche sind in folgendem Diagramm zusammengestellt:

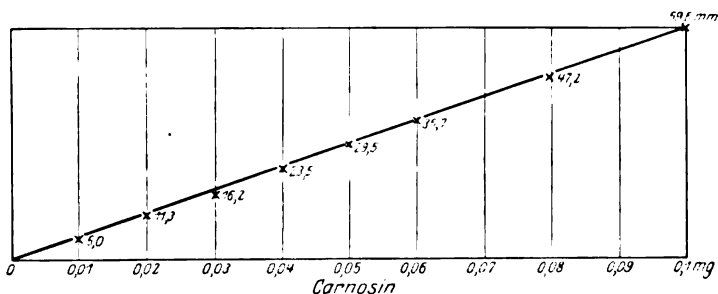


Abb. 2.

Bei Gegenwart von 0,1 mg Carnosin im Testzylinder wurde der Taucher auf 10 mm gestellt und die Ablesung am Standardzylinder mit 2 multipliziert. Die besten Werte findet man, wenn man 7 bis 10 Minuten nach dem Mischen abliest und den Mittelwert berechnet. Auf jeden Fall sind nur die maximalen Werte in Rechnung zu stellen.

Der Versuch zeigt die vollständige Proportionalität des Diazofarbstoffes mit zunehmender Konzentration des Carnosins in dem untersuchten Gebiete und bestätigt die Ergebnisse von *Hanke* und *Koessler* sowie von *Hunter*. *Clifford* fand für das Carnosin einen ungefähr um die Hälfte niedrigeren molekularen Farbenwert. Deshalb sind die von ihr angegebenen Carnosinwerte um etwa 50 % zu erniedrigen.

Ausführung der Bestimmung.

Erforderliche Lösungen. Wir verwendeten die von *Hanke* und *Koessler* angegebenen Lösungen¹.

Sulfanilsäure. 4,5 g Sulfanilsäure werden in 45 ccm 37 %iger Salzsäure ($D = 1,19$) gelöst und die Lösung mit Wasser auf 500 ccm verdünnt.

Natriumnitrit. 25 g 90 %iges Natriumnitrit werden in Wasser gelöst und auf 500 ccm aufgefüllt.

Sodalösung. 5,5 g *Merckschen* wasserfreien Natriumcarbonats werden in Wasser gelöst und auf 500 ccm aufgefüllt. Diese Lösung muß in Pyrex- oder Jenaer Glas aufbewahrt werden.

Methylorangelösung. 0,5000 g im Vakuum getrockneten Methyloranges (*Dr. Grübler*) werden in Wasser gelöst und auf 500 ccm verdünnt.

Kongorotlösung. 2,5000 g im Vakuum getrockneten Kongorots (*Dr. Grübler*) werden in 50 ccm absoluten Alkohols in einem 500-ccm-Meßkolben gelöst und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Standardlösung für Histidin. 1 ccm der Kongorotlösung und 1,1 ccm der Methylorangelösung läßt man in 250 ccm Wasser fließen und füllt mit Wasser auf 500 ccm auf (Bezeichnung des Standards: CR—MO).

Standardlösung für Carnosin. 1,25 ccm der Kongorotlösung und 0,5 ccm Methylorangelösung läßt man in 250 ccm Wasser fließen und füllt mit Wasser auf 500 ccm auf.

Bereitung der p-Diazobenzolsulfosäure. 1,5 ccm der Sulfanilsäurelösung und 1,5 ccm der Natriumnitritlösung werden in einem 50-ccm-Meßkolben gebracht. Der Kolben kommt dann für 5 Minuten in ein Eisbad. Hierauf läßt man weitere 6 ccm der Natriumnitritlösung zufließen, mischt gut und stellt den Kolben wieder für 5 Minuten in das Eisbad. Dann fügt man destilliertes Wasser bis zur Marke zu und stellt den Kolben wieder in das Eisbad. Das Diazoreagens darf nicht vor 15 Minuten nach dem Verdünnen mit Wasser verwendet werden. Es soll noch nach 24 Stunden gute Resultate geben.

Ausführung der Diazoreaktion².

(1 — x) ccm Wasser und 5 ccm der 1,1 %igen Sodalösung werden genau in den Zylinder des *Dubosq*-Kolorimeters eingemessen. 2 ccm des Diazoreagens läßt man zufließen und mischt gut durch. Man mischt etwa 30 Sekunden. Genau eine Minute nach dem Zufließen des Diazoreagens läßt man x ccm der Imidazolösung zufließen. Der Inhalt des Zylinders

¹ Journ. of biol. Chem. 39, 497, 1919.

² Nach *Hanke-Koessler*.

wird gut gemischt, der Zylinder in den Kolorimeter gestellt und der Taucher auf 20 mm eingestellt. In den anderen Zylinder kommt die Standardlösung, und die Schichtdicke des Standards wird so lange variiert, bis Farbengleichheit eintritt. Die maximale Farbenintensität tritt erst nach 5 bis 10 Minuten auf und bleibt mehrere Minuten konstant, um dann wieder abzusinken.

Das zur Reaktion verwendete Volumen der Imidazollösung kann variieren von 0,01 bis 1,0 ccm. Das Gesamtvolumen von Wasser plus Imidazollösung hat immer 1 ccm zu betragen, d. h. wenn 0,10 ccm der Imidazollösung verwendet werden, müssen 0,90 ccm Wasser in den Testzylinder gebracht werden. Dann ist $x = 0,10$ ccm und $1 - x = 0,90$ ccm.

Bestimmung des Carnosinergehalts in verschiedenen Fleischarten.

A. Ausführung nach Hunter.

Die Extraktion bei 70° wurde, wie oben angegeben, genau nach *Hunter* ausgeführt, das Eiweiß nach dem Ansäuern mit Essigsäure koaguliert und direkt im Filtrat die Diazoreaktion angestellt. Wir erhielten dabei folgende Werte:

Pferd	0,396 % Carnosin
„	0,360 % „
Rind	0,354 % „
„ (Gefrierfleisch)	0,236 % „
Schwein (geräuchert)	0,439 % „
Brasse	0,126 % „
Kabeljau	0,0 % „

B. Ausführung der Diazoreaktion in der Hopkinsfraktion.

Da die Carnosinbestimmung nach *Hunter* höhere Carnosinwerte gab, als die Bestimmungen in der Form des Carnosinkupfers und des Histidinpikrolonats, untersuchten wir die Carnosinwerte, welche man mit Hilfe der Diazokolorimetrie in der Hopkinsfraktion erhält. Die Carnosinfraktion wurde, genau wie oben unter I beschrieben, durch Fällung mit Hopkinsreagens, Zerlegung des Niederschlags mit Schwefelwasserstoff usw. hergestellt. Die Ausführung der Diazoreaktion ergab folgende Carnosinwerte:

Pferd	0,304 % Carnosin
„	0,481 % „
„	0,401 % „
„	0,383 % „
Kalb	0,467 % „
Schwein (geräuchert)	0,092 % „

In der Tabelle sieht man die Übereinstimmung der so erhaltenen Werte mit den nach *Hunter* bestimmten. Die Carnosinwerte bei Bestimmung in der Hopkinsfraktion sind nicht niedriger, sondern sogar etwas höher.

C. Diazokolorimetrie des durch Hydrolyse abgespaltenen Histidins.

In einigen Versuchen an Pferdefleisch stellten wir die Carnosinfraktion durch Fällung mit Hopkinsreagens dar und hydrolysierten die so erhaltene Carnosinlösung durch fünfstündiges Kochen mit konzentrierter Salzsäure unter Rückflußkühlung. Die Salzsäure wurde im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Calciumoxyd versetzt und die Hälfte des Volumens Alkohol zugesetzt. Der Alkohol wurde am Wasserbad im Vakuum abdestilliert, die Flüssigkeit filtriert und damit die Diazoreaktion angestellt. (Standard CR—MO für Histidin!) Wir erhielten folgende Werte:

Pferd	0,300 % Carnosin
„	0,333 % „
„	0,290 % „

Die auf diese Weise erhaltenen Carnosinwerte stimmen mit den gravimetrisch erhaltenen sehr gut überein.

IV. Die Kupferkolorimetrie.

In der schon erwähnten Arbeit von *Fürth* und *Hryntschak*¹ finden sich die ersten Versuche, das Carnosin in der Form seiner Kupferverbindung kolorimetrisch zu bestimmen. Die Carnosinfraktion wurde durch Fällung mit Phosphorwolframsäure und Silberbaryt hergestellt und dann mit Kupferhydroxyd gekocht. Das Filtrat vom überschüssigen Kupferhydroxyd wurde mit einer Standardlösung von Carnosinkupfer verglichen. *Fürth* und *Hryntschak* erhielten nach diesem Vorgang folgende Carnosinwerte:

Schwein	2,31 bis 3,12 % Carnosin
Pferd	1,80 „ 3,38 % „

Genau nach demselben Verfahren hat später *Bubanovic*² den Carnosingehalt des menschlichen Herzmuskels bestimmt. Er fand in normalen und pathologischen Herzen im Mittel 0,27 % Carnosin.

Wir führten die Kupferkolorimetrie nach einem abgeänderten Verfahren aus. Die Carnosinfraktion wurde, wie oben unter I angegeben, durch Fällung mit Mercurisulfat dargestellt. Nach der Zerlegung des Niederschlages, der Entfernung der Schwefelsäure und des Bariums wurde die Lösung der Basencarbonate auf ein solches Volumen gebracht, daß 1 ccm der Lösung 1 g Fleisch entsprach. Bei Gegenwart von Carnosin lösen die so bereiteten Fraktionen schon in der Kälte reichlich Kupferhydroxyd. Der Überschuß des Kupferhydroxyds wurde abzentrifugiert und die klare blaue Lösung mit einer Standardlösung von

¹ O. Fürth und Th. Hryntschak, diese Zeitschr. 64, 172, 1914.

² F. Bubanovic, ebendasselbst 92, 125, 1918.

Carnosinkupfer im *Dubosq'schen* Kolorimeter verglichen. Die Standardlösung enthielt 0,3% Carnosin als Carnosinkupfer gelöst. Zur Erleichterung der Lösung wurde etwas Ammoniak zugesetzt. Wir bestimmten folgende Carnosinwerte:

Pferd	0,400 %	Carnosin
„	0,420 %	„
„	0,417 %	„
„	0,378 %	„
Kalb	0,486 %	„
Kaninchen	0,179 %	„
„	0,210 %	„
Schwein (geräuchert)	0,047 %	„

Da sich in denselben Fleischproben nach dem gravimetrischen Bestimmungsverfahren immer niedrigere Werte ergeben hatten, vermuteten wir, daß sich an der Farbstoffbildung, ähnlich wie bei der Diazoreaktion außer dem Carnosin noch andere Körper beteiligen¹.

In einigen Versuchen fällten wir daher in der wie oben dargestellten Carnosinfraktion die Purine mit Silbernitrat, und im Filtrat davon die Argininfraktion mit Baryt. In der Argininfraktion ist das Carnosin vollständig enthalten. Der Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach Entfernung des Bariums wird die Lösung mit Kupferhydroxyd behandelt und nach dem Zentrifugieren kolorimetriert. Auf diese Weise erhielten wir Carnosinwerte, welche mit dem gravimetrisch bestimmten sehr gut übereinstimmten:

Pferd	0,340 %	Carnosin
„	0,430 %	„
„	0,300 %	„

Diskussion.

Die Betrachtung der Tabelle zeigt, daß die beiden gravimetrischen Bestimmungsverfahren sehr gut übereinstimmen. Im Gegensatz dazu sind die nach den kolorimetrischen Verfahren erhaltenen Werte nicht sehr verläßlich und auch untereinander nicht genügend gut vergleichbar. Die kolorimetrisch bestimmten Werte sind im allgemeinen zu hoch, da sich außer dem Carnosin noch andere Körper an der Bildung des Diazofarbstoffes beteiligen. Bei der Gegenwart von Histidin, welches ja leicht aus Carnosin entstehen kann (*Hunter* hat es in einigen Fällen mit der *Knoopschen* Reaktion nachgewiesen), wird dieses sowohl

¹ Histidin löst genau wie Carnosin frisch gefälltes Kupferhydroxyd schon in der Kälte, wobei sich die Lösung tief blau färbt. Bei eventueller Gegenwart von Histidin wird dieses also mitbestimmt.

bei der Diazo- als auch bei der Kupferkolorimetrie mitbestimmt. Ferner beteiligen sich nach *Hunter* die Purine mit ungefähr 3 % an der Bildung des Diazofarbstoffes.

Das einzige Verfahren, bei welchem man sicher sein kann, nur das Carnosin zu bestimmen, beruht auf der *Isolierung desselben in der Form seiner Kupferverbindung*. Das Carnosinkupfer ist durch seine charakteristischen sechseckigen Kristalle sowie durch seinen Kupfergehalt von 20,80 % leicht zu erkennen und zu identifizieren. Bei eventueller Gegenwart von Histidin wird dieses nicht mitbestimmt. In einer Histidinlösung löst sich zwar Kupferhydroxyd ebenso wie in Carnosinlösung mit blauer Farbe auf, doch haben wir in mehreren Versuchen keine kristallisierte Kupferverbindung des Histidins isolieren können. Löst man die durch Aceton gefällten blauen Flocken in Ammoniak auf und läßt das Ammoniak langsam verdunsten, so bleibt ein schmutzig grüner amorpher Lack zurück. Bei einigen Fleischproben erhielten wir neben den charakteristischen Carnosinkupferkristallen einen ganz ähnlich aussehenden grünen lackartigen Körper, der vielleicht aus Histidinkupfer bestand. *Die Trennung von den schweren Carnosinkupferkristallen ist durch Aufschwemmen und Dekantieren sehr leicht möglich.*

Auffallend sind die Resultate, die an *geräuchertem Fleisch* erhalten wurden. Bei der Diazokolorimetrie nach *Hunter* ergaben sich sehr hohe Werte: 0,407 bis 0,439 %. Bestimmt man den Diazowert nach der Fällung mit Mercurisulfat, so erhält man dagegen nur 0,092 % Carnosin. Die Carnosinfraktionen lösen nur sehr wenig Kupferhydroxyd, so daß die Kupferkolorimetrie nur Werte von 0,030 bis 0,047 % ergab. Kristallisiertes Carnosinkupfer wurde gar keines erhalten. *In geräuchertem Fleisch ist also unverändertes Carnosin gar nicht oder nur in Spuren vorhanden, dagegen ist noch eine große Menge eines Stoffes zugegen, der die Diazoreaktion gibt.* Dieser Körper kann aber auch nicht Histidin sein, wie wir zuerst vermuteten, denn bei Gegenwart von Histidin könnten nicht so große Unterschiede zwischen den diazokolorimetrisch und kupferkolorimetrisch bestimmten Werten auftreten. In zwei Proben geräucherten Fleisches gelang es uns auch nicht, mit Hilfe der von *Hunter* modifizierten *Knoopschen* Reaktion Histidin nachzuweisen. Der nach *Hunter* bestimmte hohe Diazowert ist daher weder auf Carnosin noch auf Histidin zu beziehen. Eine Erklärung für dieses Verhalten wäre vielleicht die Annahme, daß das Carnosin beim Räuchern in ein inneres Anhydrid übergeht, so daß die Fähigkeit zur Bildung einer Kupferverbindung verloren geht, dagegen die Diazoreaktion bestehen bleibt.

Der *tatsächliche Carnosingehalt* der Muskulatur scheint uns durch die kolorimetrischen Verfahren nicht genau bestimmbar, da diese fast

immer zu hohe Werte geben. Dagegen glauben wir bei der Isolierung des Carnosins als Carnosinkupfer dieses annähernd quantitativ zu bestimmen. Diese Bestimmung beruht auf zwei Fällungen: Die Fällung mit Merkurisulfat in schwefelsaurer Lösung ist so vollständig, daß noch $\frac{1}{1000}$ % Carnosin nach 5 Stunden gefällt wird. In dem Filtrat vom Niederschlag ist nach der Entfernung des Quecksilbers die Diazo-reaktion immer negativ. Die Fällung des Carnosinkupfers in Aceton ist ebenfalls fast quantitativ, da dasselbe in Aceton unlöslich ist.

Tabelle.

	Bestimmung des Carnosins						
	als Carnosin- kupfer	als Histidin- pikrolonat	als Histidin, diazokolori- metrisch	diazokolori- metrisch nach Hunter	diazokolorimetr. in der Fällung mit Mercurisulfat	kupferkolori- metrisch	kupferkolori- metrisch i. d. Silber- baryt- fraktion
	%	%	%	%	%	%	%
Rind	0,313						
"	0,308	0,314		0,354			
Rind, Gefrier- fleisch	0,127			0,236			
Pferd	0,320	0,345					
"	0,292						
"	0,289	0,289					
"	0,263	0,285					
"	0,383				0,481		0,430
"	0,307			0,360	0,383	0,420	0,300
"		0,296	0,300			0,400	
"			0,333			0,417	0,340
"			0,290		0,304		
"				0,396	0,401	0,378	
Kaninchen	0,066					0,179	
"						0,210	
Kalb					0,467	0,486	
Schwein, geräuch.	θ			0,439	0,092	0,047	
"	θ			0,407		0,030	
Brasse	0,088			0,126			
Kabeljau	θ			θ			

Zusammenfassung.

1. Das Carnosin wurde quantitativ nach einem verbesserten Verfahren in der Form seiner charakteristischen *Kupferverbindung* bestimmt. Im Pferdemuskel sind durchschnittlich 0,3 % enthalten.

2. Genau dieselben Werte erhält man, wenn man das Carnosin nach der Hydrolyse als *Histidinpikrolonat* bestimmt.

3. Das *diazokolorimetrische* Verfahren wurde genau untersucht und die Ergebnisse von *Hanke* und *Koessler*, sowie von *Hunter* für richtig befunden. Die Resultate von *W. M. Clifford* konnten nicht bestätigt werden.

4. Die Diazokolorimetrie gibt zu hohe Werte, auch wenn man sie in der Fällung mit Mercurisulfat durchführt.

5. Die *Kupferkolorimetrie* gibt ähnliche Werte wie die Diazokolorimetrie.

6. *Gefrierfleisch* enthält viel weniger Carnosin als frisches Fleisch.

7. In *geräuchertem* Fleisch ist Carnosin gar nicht oder nur in Spuren vorhanden. Histidin konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Dagegen sind große Mengen eines Körpers anwesend, der die Diazo-reaktion gibt, aber von Mercurisulfat anscheinend nicht gefällt wird.

8. In den zehn untersuchten Proben von Pferdefleisch war der Carnosingehalt annähernd konstant.

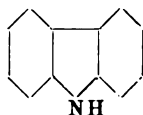
Über charakteristische Farbreaktionen der Milchsäure, des Methylglyoxals und der Kohlehydrate mit Carbazol und Schwefelsäure.

Von
Zacharias Dische.

(Aus der Abteilung für physiologische Chemie im Wiener physiologischen
Universitätsinstitut.)

(Eingegangen am 23. Juli 1927.)

Während das *Indol* mit Kohlehydraten und vielen aliphatischen Aldehyden in konzentrierter Schwefelsäure in der Hitze einen braunen Farbstoff bildet, ergibt das *Carbazol*,



in dem ein mit einem Indolring kondensierter Benzolring vorliegt, sowohl mit Kohlehydraten wie mit aliphatischen Aldehyden schöne Farbreaktionen, die aber bei den einzelnen Substanzen ganz verschieden ausfallen. Diese mannigfaltigen Reaktionen können zur Erkennung einiger physiologisch wichtiger Substanzen dienen. Da nämlich aus *α -Oxysäuren* unter Einwirkung konzentrierter Schwefelsäure in der Hitze Aldehyde entstehen, so ergeben auch diese Säuren mit Carbazol und Schwefelsäure schöne Farbreaktionen, die im Falle der *Milchsäure* charakteristisch sind.

Die Reaktionen werden am besten folgendermaßen ausgeführt: Ein Teil der Lösung, die auf den betreffenden Stoff untersucht werden soll, wird mit zwei oder vier Teilen konzentrierter H_2SO_4 (spezifisches Gewicht 1,84) unter Kühlung versetzt. Nach dem Erkalten wird 0,1 ccm einer alkoholischen halbprozentigen Carbazollösung (*Merck*) hinzugefügt, umgeschüttelt und durch 10 Minuten in kochendem Wasserbade erwärmt. Je nachdem, ob man zwei oder vier Teile H_2SO_4 hinzufügt, erhält man oft bei demselben Stoffe ganz verschiedene Farbreaktionen. Wir wollen weiter unten die bei 2 ccm H_2SO_4 auftretende Reaktion mit R I, die bei 4 ccm auftretende als R II bezeichnen. R II tritt immer auf, wenn mehr als 2 ccm H_2SO_4 hinzugefügt werden, erreicht

aber ihre größte Intensität beim Verhältnis 1 Lösung: 4 H_2SO_4 . Die α -Oxysäuren geben in der Regel überhaupt keine Farbreaktion, wenn 1 Teil Lösung mit nur 2 Teilen H_2SO_4 versetzt wird, wohl aber bei Hinzufügen von mehr Säure. Dies dürfte damit zusammenhängen, daß die Reaktion der α -Oxysäuren auf Bildung von Aldehyd unter dem Einfluß von H_2SO_4 beruht. Nun wissen wir aber z. B. von der Milchsäure, daß sie nur dann in Acetaldehyd unter dem Einfluß von Schwefelsäure übergeht, wenn auf 1 Teil wässriger Lösung mehr als 2 Teile konzentrierter H_2SO_4 kommen. Man kann deshalb auch mit Oxysäuren die der R I der Aldehyde entsprechende Farbreaktion erzielen, wenn man folgendermaßen verfährt: 1 Teil wässriger Lösung wird mit 4 Teilen konzentrierter H_2SO_4 versetzt und zunächst ohne Hinzufügen von Carbazol in kochendem Wasserbade einige Minuten erhitzt. Nach dem Erkalten wird 1 Teil H_2O dazugegeben, so daß jetzt das Verhältnis wässrige Lösung zu Schwefelsäure wie 1:2 ist. Nach Hinzufügen von 0,1 ccm halbprozentiger Carbazollösung wird 10 Minuten erhitzt. Bei der Milchsäure tritt unter diesen Bedingungen dieselbe Farbreaktion wie bei R I des Acetaldehyds auf. Diese dritte hier beschriebene Form der Reaktion ist in der weiter unten folgenden Tabelle II unter der Rubrik R III angegeben.

In der folgenden Tabelle I sind die Frabreaktionen einiger aliphatischer Aldehyde und Ketone verzeichnet, während in der Tabelle II

Tabelle I.

Reaktionen einiger Aldehyde und Kohlehydrate.

	R I 1 ccm Lösung + 2 ccm H_2SO_4 + 0,1 ccm $\frac{1}{2}$ %iger Carbazol- lösung 10 Minuten erhitzt	R II 1 ccm Lösung + 4 ccm H_2SO_4 + 0,1 ccm $\frac{1}{2}$ %iger Carbazol- lösung 10 Minuten erhitzt	Anmerkungen
C ₁ Formaldehyd . .	blau	grün	Bei höherer Konzentration des Formaldehyds fällt blauer Farbstoff aus
C ₃ { Acetaldehyd . .	olivengrün	braun	
Glykolaldehyd . .	blaugrün	blaugrün	
Glyoxylsäure . .	blau		
Propylaldehyd . .	braun	braun	
C ₃ { Methylglyoxal . .	blau	olivengrün	Noch bei 0,001 %iger R I deutlich zu sehen
Glycerinaldehyd	"	"	Ebenso
Dioxyaceton . .	"	"	"
C ₄ { Butylaldehyd . .	braun	braun	
Acetaldol . . .	"	"	
Crotonaldehyd . .	"	"	
C ₆ Isovaleraldehyd	violettbraun	rot	
C ₇ Önanthol . . .	grün	braun	Sehr schwache Reaktion
C ₈ Octylaldehyd . .	braun		Ebenso
Arabinose	lila	rot	
Hexosen	"	"	Noch bei 0,001 % deut- lich zu sehen
Glucuronsäure . .	"	"	R I etwa halb so stark als bei Traubenzucker

Tabelle II.

Reaktionen einiger Oxyssäuren mit Carbazol und Schwefelsäure. R I fehlt meist völlig, nur bei Glycerinsäure angedeutet.

	R II 1 ccm Lösung + 4 ccm H ₂ SO ₄ + 0,1 ccm 1/2 %iger Carbazol- lösung 10 Minuten erhitzt	R III 1 ccm Lösung + 4 ccm H ₂ SO ₄ 4 Min. erhitzt, nach Erkalten 1 ccm H ₂ O + 0,1 ccm Carbazollösung 10 Minuten erhitzt	Anmerkungen
Glykolsäure	blau	blau	R III noch bei 0,01 % deutlich zu sehen
Milchsäure	braun	olivengrün	R II und R III noch bei 0,005 % deutl. zu sehen
Brenztraubensäure .	braunrot	grün	Erst bei 0,25 % deutlich zu sehen
Glycerinsäure . . .	grün	blau	Erst bei 0,1 % deutlich zu sehen
Äpfelsäure	braun	gelbgrün	Erst bei 1 % deutlich zu sehen
Weinsäure	grün	blau	Erst bei 1/2 % deutlich zu sehen
Gluconsäure	rot	lila	Ebenso
Zuckersäure	"	"	"

das Verhalten einiger physiologisch interessanter Oxyssäuren angegeben ist. Nach dem oben Gesagten sind die Tabellen ohne weiteres verständlich.

Ameisensäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Oxalsäure geben keine Reaktion mit Carbazol, ebensowenig Tryptophan, Harnsäure, Kreatin. Alanin gibt in 1 %iger Lösung als R II eine ganz schwache rote Farbe, ebenso Citronensäure. Tyrosin in 0,1 %iger Lösung als R II ganz schwache grüne Färbung. Glycerin gibt in 1 %iger Lösung als R I deutliche Violettfärbung, als R II rote Farbe. Lävulinsäure in 1 %iger Lösung als R I und R II schwache braune Farbe. Aceton in 1/2 %iger Lösung ebenso. Oxybuttersäure keine Färbung.

Aus der obigen Zusammenstellung ist zu ersehen, daß die Farbreaktionen der *Milchsäure* diese, wenigstens soweit physiologische Verhältnisse in Betracht kommen, eindeutig charakterisieren. (Von den in der Literatur beschriebenen Farbreaktionen der Milchsäure ist nur die von *Herzog* angegebene ebenso spezifisch und empfindlich, doch ist ihre Ausführung weit umständlicher, da die Milchsäure zuerst in Acetaldehyd übergeführt, derselbe abdestilliert und mit Hilfe der Reaktion von *Rimini* nachgewiesen wird.) Was das *Methylglyoxal* anbetrifft, so zeigt es dieselben Reaktionen wie die Triosen *Glycerinaldehyd* und *Dioxyaceton*. Nach *Dische* und *Laszlo* aber ist Methylglyoxal durch Kupfer und Kalkhydrat nicht fällbar, was bei den Triosen der Fall ist.

Nun hat der Verfasser vor kurzem zusammen mit *D. Laszlo* eine Methode zur kolorimetrischen Bestimmung der Milchsäure im Blute

ausgearbeitet. Dieselbe basiert auf der Farbreaktion, die die Milchsäure mit Hydrochinon und H_2SO_4 erhitzt ergibt. Diese Reaktion ist für die Milchsäure nicht spezifisch. Es zeigen vielmehr gerade solche Substanzen, die möglicherweise beim Abbau des Zuckers im Organismus als Zwischenstufen auftreten, wie das Methylglyoxal oder das Acetaldol, mit Hydrochinon eine Farbreaktion von fast derselben Intensität wie die Milchsäure. Wenn auch im Blute diese Substanzen nicht vorkommen, so könnten sie doch bei der Organglykolyse, besonders unter pathologischen, bisher nicht genügend untersuchten Bedingungen, in Mengen, die ins Gewicht fallen, auftreten. Diese Stoffe zeigen nun mit Carbazol und Schwefelsäure sehr empfindliche und für physiologische Verhältnisse ausreichend charakteristische Farbreaktionen, die es ermöglichen dürften, sich nötigenfalls die Gewißheit zu verschaffen, ob die betreffenden Stoffe in einer Lösung in nennenswerter Menge vorkommen. In diesem Falle müssen selbstverständlich die fast immer vorhandenen Kohlehydrate vorher restlos ausgefällt werden. Da dies jetzt nach *Clausen-van Slyke* durch Kupferkalkfällung meistens geschieht, so muß man darauf achten, daß die geringen Mengen von Kupfer, die nach der *Clausenschen* Fällung in der Lösung noch zurückbleiben, vor Ansetzen der Carbazolreaktion aus der zu untersuchenden Lösung mit H_2S entfernt werden müssen; denn schon ganz geringe Mengen von Schwermetallsalzen erzeugen mit Carbazol und Schwefelsäure eine intensiv grüne Färbung.

Über die Oxydation von Phenol mit Wasserstoffsuperoxyd unter Zusatz von Eisensalzen.

Von

Helene Goldhammer.

(Aus der Abteilung für physiologische Chemie im Wiener physiologischen
Universitätsinstitut.)

(Eingegangen am 23. Juli 1927.)

I.

Durch die Untersuchungen von *Spiro*¹, *Adler* und *Wiechowski*², *Neuberg*³ und anderen war es bekannt, daß viele Verbindungen beim Oxydieren mit Wasserstoffsuperoxyd unter Zusatz von Eisensalzen nach vorübergehender Blaugrünfärbung Melanine lieferten. *Martinon*⁴ hatte seinerzeit beobachtet, daß bei der Oxydation von Phenol mit Wasserstoffsuperoxyd mit und ohne Eisen Brenzkatechin, Hydrochinon und Chinon auftreten. Phenole oder, allgemeiner ausgedrückt, aromatische Monoxyverbindungen zeigen, wie *K. Spiro* gefunden hat, bei vorsichtiger Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd bei Gegenwart von Eisensulfat eine vorübergehende Grünfärbung, die beim Alkalisieren in Rotviolett umschlägt, und die darauf hindeutet, daß sich ein ortho-Dioxyprodukt bildet, welches dann mit dem Eisensalz die charakteristische Grünfärbung gibt.

Als Ziel unserer Arbeit schwebte mir nun vor, die analoge Oxydation von Tyrosin zu studieren, um etwa die Bildung von Dioxyphenylalanin nachzuweisen. Wir hofften, die Grünfärbung als Grundlage einer

¹ *Spiro*, Zeitschr. f. anal. Chem. **54**, 345, 1915.

² *Adler* und *Wiechowski*, Ber. **55**, 3030, 1923; Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **92**, 22, 1922.

³ *Neuberg*, diese Zeitschr. **20**, 523, 1909.

⁴ *Martinon*, Bull. de la Soc. de Chem. **43**, 156, 1885.

kolorimetrischen Messung des gebildeten Dioxyproduktes benutzen zu können, und begannen zu diesem Zweck zuerst die Oxydation des einfachen Phenols C_6H_5OH nach dieser Richtung hin zu studieren. Die Grünfärbung erwies sich aber bald als all zu unbeständig, und da sie, besonders bei etwas stärkerer Oxydation, in eine Braunfärbung (Melaninbildung!) überging, wurden die Lösungen mit Seignettesalz alkalisch gemacht und die resultierende rot-violette Färbung kolorimetriert. Als Standard wurde eine Brenzkatechinelösung benutzt. Wir suchten auf diese Weise die besten Oxydationsbedingungen für die Bildung von Brenzkatechin zu finden. Es zeigte sich aber bald auf Grund von anderen Farbreaktionen, daß sich in den oxydierten Lösungen nicht nur Brenzkatechin vorfand, sondern daß auch weitere Oxyprodukte, z. B. *Pyrogallol*, auftraten, welches letztere bekanntlich eine Rotfärbung in alkalischer Lösung gibt, die dann in die Kolorimetrie mit einbezogen wurde.

Wir versuchten nun, eine *quantitative Trennungsmethode von Brenzkatechin und Pyrogallol* auszuarbeiten, die uns erlauben würde, die beiden Produkte im Oxydationsgemisch gesondert zu bestimmen.

II.

Bekanntlich vermögen Brenzkatechin wie auch Pyrogallol *Silbernitrat* zu reduzieren; aber das Reduktionsvermögen von Pyrogallol ist um so vieles stärker, daß es (zum Unterschiede von Brenzkatechin) selbst in saurer Lösung Silber abzuscheiden vermag. (Selbstverständlich gilt das nur für die Dauer von einigen Stunden. Nach 12 Stunden ist auch eine schwach saure Silbernitratlösung von Brenzkatechin reduziert.) Die erste Methode, die wir auszuarbeiten versuchten, beruhte darauf, daß man in einem Brenzkatechin-Pyrogallolgemisch zuerst in saurer Lösung das Pyrogallol bestimmte, dann die Lösung ammoniakalisch machte und die Reduktionssumme des Brenzkatechins und des übriggebliebenen Pyrogallols (in saurer Lösung ist das Reduktionsvermögen naturgemäß sehr geschwächt) bestimmte. Die Methode führte zu keinen brauchbaren Resultaten und der Grund hierfür war, wie wir feststellen konnten, die Bildung von *Purpurogallin*, welches bei der Reduktion aus Pyrogallol entstand. Durch diesen dritten Faktor wurden die Verhältnisse so kompliziert, daß wir einen anderen Weg einschlagen mußten.

Wir bestimmten in einem Teil der Lösung bei saurer Reaktion das Pyrogallol, und in einem anderen bei neutraler Reaktion die Summe des Brenzkatechins und Pyrogallols. Selbstverständlich wurden vorher die Silberfaktoren der beiden Substanzen beim Pyrogallol sowohl bei saurer wie bei neutraler Reaktion bestimmt.

III.

Wir oxydierten nun *Phenol* mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisensulfat unter wechselnden Bedingungen, wobei wir ähnliche Versuchsanordnungen erhielten, wie die bei früheren Versuchen dieser Art in der Literatur angegebenen¹. Die ausführlichen Angaben folgen später.

Die Versuche, durch Oxydation von *Tyrosin* zu Dioxyphenylalanin zu gelangen, führten zu keinerlei Resultaten. Wohl konnte man bei vorsichtiger Oxydation die Grünfärbung als Beweis des vorhandenen Dioxyproduktes beobachten; sie ging aber so rasch in eine Braunfärbung über, daß an eine kolorimetrische Auswertung gar nicht zu denken war. Die Versuche zur präparativen Darstellung scheiterten an der Überempfindlichkeit des Dioxyphenylalanins gegenüber Ammoniak oder Alkalien. Selbst die geringe Zeit, deren man bedurfte, um das Eisen auszufällen und zu filtrieren, und während welcher wir die Lösung ammonikalisch halten mußten, genügte schon, um das etwa vorhandene Dioxyphenylalanin zu zerstören. Da die Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd ohne Gegenwart von Eisen viel langsamer vor sich geht, versuchten wir auch dies — aber ebenfalls resultatlos, da die erhaltenen Mengen des Dioxyphenylalanins viel zu gering waren, als daß man hätte versuchen können, es vom Tyrosin zu trennen.

IV. Silberwertbestimmung.

a) Silberwertbestimmung des Brenzkatechins.

Eingewogene Mengen von Brenzkatechin wurden in Wasser aufgelöst, mit 10 bis 20 cem gesättigter Ammonsulfatlösung und einem großen Überschuß von Silbernitrat versetzt und aufgeköcht. Die reduzierte Lösung wurde dann im Dunkeln aufbewahrt, nach 12 Stunden filtriert und bis zum Verschwinden der Silberreaktion mit warmem Wasser gewaschen. Das abgeschiedene Silber wurde in Salpetersäure gelöst und, sei es durch Titration mit Rhodanammon nach *Volhard*, sei es gravimetrisch, bestimmt. Trotz genauer Ausführung und Einhaltung derselben Versuchsbedingungen ergab sich eine Schwankungsbreite von ungefähr 12 %.

Die Lösung des Silbers in Salpetersäure war trotz aller Bemühungen nie ganz farblos, sondern immer schwach gelb gefärbt, was die Genauigkeit der *Volhard*-Titration beeinträchtigte, so daß wir zur gravimetrischen Bestimmungsmethode übergingen. Es scheint dies mit der Fähigkeit des Brenzkatechins zusammenzuhängen, kolloides Silber zu bilden.

¹ *Henderson und Boyd*, Journ. 97, 1660; *Cross und Bevan*, Ber. 33 II, S. 2018.

Die gefundenen Silberwerte waren: Je 1 g Brenzkatechin entsprechend 1,36 g Ag, 1,198 g Ag, 1,362 g Ag, 1,225 g Ag, 1,285 g Ag.

Als Durchschnittswert für die Berechnungen nahmen wir den Wert: 1 g Brenzkatechin entspricht 1,286 g Ag. Es entspricht dies ungefähr einer Relation 1 Mol. Brenzkatechin: 1,3 Atom Ag. Der Vorgang ist also kein durchsichtiger.

b) Silberwertbestimmung des Pyrogallols bei neutraler Reaktion.

Der Silberwert des Pyrogallols wurde genau so wie der des Brenzkatechins bestimmt. Die gefundenen Werte waren: 1 g Pyrogallol entspricht 3,67 g Ag, 3,612 g Ag, 3,601 g Ag, 3,73 g Ag.

Der höchste Wert war 3,73 g Ag, der niedrigste 3,601, was einer Differenz von 3,4 % entspricht.

Der Mittelwert, den wir unseren Bestimmungen zugrunde legten, war: 1 g Pyrogallol entspricht 3,653 g Ag. Es entspricht dies annähernd der Relation 1 Mol. Pyrogallol: 4 Atome Ag.

c) Silberwertbestimmung des Pyrogallols in saurer Lösung.

Eine eingewogene Menge von Pyrogallol wurde in Wasser aufgelöst mit 1 %iger Schwefelsäure und mit einem Überschuß von Silbernitrat versetzt. Die Schwefelsäure wurde in solcher Menge zugesetzt, daß die Endkonzentration der Lösung ungefähr 0,3 %ig war. (Die Grenzen sind aber sehr weit, so daß wir auch bei halb als auch bei doppelt so starker Konzentration dieselben Werte bekommen.)

Das Silber wird nach einer Stunde abfiltriert, gewaschen, in Salpetersäure gelöst und titriert. Diese Silberlösung ist nämlich farblos, so daß man die *Volhard*-Titration anwenden kann. Die gefundenen Werte waren: 1 g Pyrogallol entspricht: 1,274 g Ag, 1,294 g Ag, 1,283 g Ag, 1,298 g Ag.

Der Mittelwert, den wir unseren Berechnungen zugrunde legten, betrug: 1 g Pyrogallol entspricht 1,286 g Ag, entsprechend einer Relation von etwa 1 Mol. Pyrogallol: 1,2 Atome Ag.

Die Trennungsmethode wurde an Gemengen von Pyrogallol und Brenzkatechin von bekanntem Gehalt überprüft. Dabei wurde erst in neutraler Lösung die Summe der Silberwerte von Pyrogallol und Brenzkatechin bestimmt, dann in saurer Lösung der Silberwert des Pyrogallols allein.

Zum Beispiel: 1 g Pyrogallol und 1 g Brenzkatechin wurden in 200 ccm Wasser aufgelöst. In 20 ccm der Lösung wurde bei saurer

Reaktion als Silberwert des Pyrogallols 0,12936 g Ag gefunden, was für die ganze Lösung einem Silberwert von 1,2936 g Ag und (umgerechnet auf den Silberfaktor 1,286) 1,005 g Pyrogallol entspricht. In weiteren 20 ccm wurde bei neutraler Reaktion der Silberwert 0,4896 g Ag gefunden, was für die ganze Lösung dem Werte 4,896 g entspricht. 1,005 g (statt wie berechnet 1,000) Pyrogallol entsprechen bei neutraler Reaktion einem Silberwert von 3,673 g Ag.

$4,896 - 3,675 = 1,221$ g Ag ist also der Silberwert des in der Lösung vorhandenen Brenzkatechins, was umgerechnet 0,9495 Brenzkatechin (statt wie berechnet 1,00) entspricht.

Mehrere Beispiele dieser Art ergeben ähnliche Übereinstimmung.

V. Oxydation von Phenol.

1. 9,59 g in Wasser gelösten Phenols wurden mit 10 ccm einer 0,5%igen Eisensulfatlösung und mit 10 ccm 1%igen Wasserstoffsuperoxyds, welche auf 100 ccm verdünnt waren, versetzt. Nach 24 Stunden wurden die spärlich aufgetretenen Melanine abfiltriert und gewogen. Menge 0,048 g. Die Lösung wurde mit Wasserdampf bis zum Verschwinden der Phenolreaktion destilliert, der phenolfreie Rückstand wurde erschöpfend ausgeäthert und der Äther abdestilliert: Gewicht des ätherlöslichen Rückstandes 1,45 g. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und, da er sich darin nicht vollständig löste, filtriert. Der ungelöste Rückstand wog 0,5 g und erwies sich durch seinen Schmelzpunkt und seine Farbreaktionen als *Purpurogallin*, welches wahrscheinlich aus Chinon und Pyrogallol, die beide bei der Oxydation entstehen, entstanden ist. Dem Filtrat wurde ein aliquoter Teil entnommen, mit Bleizucker gefällt und filtriert. Das Filtrat reduzierte noch schwach Silbernitrat.

Es wurde ausgeäthert, der ätherische Rückstand war aber so minimal, daß er nicht weiter bestimmt wurde. Nach den Farbreaktionen zu schließen, handelte es sich um Spuren von Hydrochinon. Der Bleizuckerniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, filtriert, das Filtrat durch Luftdurchleiten und Eindampfen vom Schwefelwasserstoff befreit und in der Lösung Pyrogallol neben Brenzkatechin bestimmt. Bei der Reduktion in saurer Lösung bekamen wir, auf die Gesamtmenge umgerechnet, einen Silberwert von 0,283 g Ag; bei der Reduktion in neutraler Lösung einen von 1,502 g Ag, was umgerechnet 0,22 g Pyrogallol und 0,543 g Brenzkatechin entspricht. Die Ausbeute an Brenzkatechin beträgt also 5,6%.

2. 10 g in Wasser gelösten Phenols wurden zuerst mit 10 ccm einer 1%igen Wasserstoffsuperoxydlösung, die auf 100 ccm verdünnt war,

und dann mit 10 ccm einer 0,5 %igen Eisensulfatlösung versetzt. Nach 24 Stunden wurden die Melanine abfiltriert (Menge 0,028 g) und die Lösung weiter wie unter 1. behandelt. Der ätherische Rückstand war diesmal um vieles geringer, er wog nur 0,35 g. Er war fast gänzlich in Wasser löslich, der Purpurogallinanteil betrug 0,02 g. Die Lösung gab keine Pyrogallolreaktionen, und bei der Bestimmung erwies sich, daß sie nur Brenzkatechin enthielt. Der gefundene Silberwert betrug 0,431 g Ag, was 0,34 g Brenzkatechin, also einer Ausbeute von 3,4 % entspricht.

3. 10 g Phenol wurden in Wasser gelöst, mit 2,7 g Eisensulfat und mit 1 %igem Wassersuperoxyd im molaren Verhältnis 1 : 1 (also einer viel größeren Menge als früher) versetzt. Nach 24 Stunden wurden die Melanine abfiltriert (Menge 0,734 g) und die Lösung wie gewöhnlich verarbeitet. Der Ätherrückstand wog 4,68 g. Die Purpurogallinmenge war minimal, im Filtrat des Bleizuckerniederschlags fanden sich wieder kleine Mengen Hydrochinon. Die Ausbeute bestand fast gänzlich aus Brenzkatechin. Die Silberreduktion in saurer Lösung war minimal. Die Reduktion in neutraler Lösung ergab 5,887 g Ag, was 4,57 g Brenzkatechin entspricht. Die Pyrogallolmenge = 0,11 g, Brenzkatechinausbeute 45,7 %.

4. 10 g Phenol wurden mit 5,56 g Eisensulfat (das ist die doppelte Eisenmenge wie in Versuch 3) und mit Wasserstoffsuperoxyd im Verhältnis 1 : 1 versetzt. Die nach 24 Stunden abfiltrierte Melaninmenge betrug 0,076 g.

Die Lösung wurde wie gewöhnlich verarbeitet, der Ätherrückstand betrug 2,75 g. Der in Wasser unlösliche Teil wog 0,2 g.

Der Bleizuckerniederschlag wurde diesmal mit verdünnter Schwefelsäure zerlegt, das Bleisulfat abfiltriert, das Filtrat ausgeäthert, der ätherische Rückstand in Wasser aufgenommen und darin wie gewöhnlich Brenzkatechin und Pyrogallol bestimmt. Die in neutraler Lösung abgeschiedene Silbermenge betrug 1,684 g Ag, die in saurer Lösung 0,121 g Ag, was einer Pyrogallolmenge von 0,094 und einer Brenzkatechinmenge von 1,04 g entspricht. Brenzkatechinausbeute 10 %.

Zusammenfassung.

1. In Bestätigung der Angaben *K. Spiros* wurde bei der Oxydation von Phenol mit H_2O_2 bei Gegenwart von Eisensulfat stets Brenzkatechin in nicht unerheblichen Mengen gefunden. Das bei analoger Behandlung des Tyrosins auftretende Ortho-Dioxyderivat trat nur in so geringen Mengen auf und war so vergänglicher Natur, daß an eine quantitative Auswertung nicht zu denken war.

2. Bei Oxydation des Phenols traten neben dem Brenzkatechin auch Pyrogallol, Purpurogallin und Spuren von Hydrochinon auf.

3. Die quantitative Bestimmung dieser Produkte nebeneinander wurde derart durchgeführt, daß das Oxydationsgemenge nach Beseitigung des Phenols durch Wasserdampfdestillation mit Äther in einem rotierenden Extraktionsapparat erschöpft wurde. Das Purpurogallin wurde mit Hilfe seiner Schwerlöslichkeit in Wasser abgetrennt, Brenzkatechin und Pyrogallol durch die Bleizuckerfällung von Hydrochinon getrennt. Zur Bestimmung von Brenzkatechin neben Pyrogallol wurde ein Verfahren ausgearbeitet, welches auf dem Umstande beruht, daß Pyrogallol bereits bei saurer Reaktion, Brenzkatechin aber erst bei neutraler Reaktion Silbernitrat reduziert.

4. Die Ausbeuten an Brenzkatechin variierten je nach Umständen zwischen 3 bis 45 %. Die Ausbeuten an Melaninen waren sehr gering, die höchste erzielte Ausbeute betrug 7,6 %.

Über die Synthese des d,1-2,5-Dioxyphenylalanins.

Von

Kinsaburo Hirai.

(Aus der Kinderklinik der medizinischen Akademie zu Nagasaki.)

(Eingegangen am 24. Juli 1927.)

Nachdem es mir gelungen war, unter Anwendung der Glycinanhydridmethode von *T. Sasaki* das d, 1-3, 4- und das d, 1-2, 4- Dioxyphenylalanin darzustellen, ging ich daran, auch das d, 1-2, 5-Dioxyphenylalanin mit Hilfe desselben Verfahrens zu synthetisieren. Die Methodik selbst war fast die gleiche wie in den beiden bereits beschriebenen Fällen. Zunächst suchte ich den Gentisinaldehyd bzw. den Gentisinaldehyd-dimethyläther aus Hydrochinon oder Hydrochinon-dimethyläther nach *Tiemann* und *Müller*¹ darzustellen, die Ausbeute war aber sehr gering. Eine bedeutend bessere Ausbeute an Gentisinaldehyd erhielten wir nach der Vorschrift von *O. Neubauer* und *L. Flatow*², welche uns die Möglichkeit gab, diesen Aldehyd aus Salicylaldehyd durch Behandlung mit Natronlauge und Kalumpersulfat zu gewinnen. Der Gentisinaldehyd wurde ebenso wie der Resorcyaldehyd mit Dimethylsulfat methyliert; die Kondensation des Gentisinaldehyd-dimethyläthers erfolgte mit Glycinanhydrid, die Spaltung wurde darauf mit Jodwasserstoffsäure bewirkt. Die Reaktion verlief ganz glatt wie beim d, 1-Resorcyalanin. Da mit Hilfe der Glycinanhydridmethode von *T. Sasaki* die Synthese von drei Isomeren des Dioxyphenylalanins geglückt war, habe ich mich nun bemüht, die Ausbeute möglichst zu erhöhen. Im Falle des d, 1-3, 4-Dioxyphenylalanins vermochte ich durch einige Übung ein reineres Präparat in besserer Ausbeute zu gewinnen und mit demselben verschiedene biochemische Versuche anzustellen. Bei zwei anderen Isomeren, nämlich dem d, 1-2, 4- und dem d, 1-2, 5-Dioxyphenylalanin, besteht auch die Aussicht, eine noch bessere Ausbeute zu erzielen. Sowohl das 2, 4- als auch das 2, 5-Dioxyphenylalanin waren bisher noch nicht in der Natur aufgefunden

¹ *Tiemann* und *Müller*, Ber. 14, 1985, 1881.

² *O. Neubauer* und *L. Flatow*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 382, 1907.

Exp. - Synthesis of d, 1-2, 5-Dioxyphenylalanine.

worden, und wie ich schon in meiner vorangegangenen Mitteilung betonte, ist es von besonderer Bedeutung, solche in der Natur nicht vorkommenden Aminosäuren vom biochemischen Standpunkt aus zu erforschen. Vor allem interessiert es uns, die Beziehungen zwischen derartigen Aminosäuren und den Hormonen oder Vitaminen aufzudecken. Ein englischer Forscher, *C. H. Harington*¹, berührte diesen Gegenstand jüngst in einer hochinteressanten Arbeit über das Thyroxin, die wirksame Substanz der Schilddrüse. Nach den Befunden dieses Autors stellt das Thyroxin nichts anderes dar als eine jodhaltige Aminosäure mit zwei Benzolkernen und mit Alanin in der Seitenkette.

Hier möchte ich auch erwähnen, daß ich durch die Untersuchung des Dioxyphenylalanins eine Erklärung für die Melaninbildung aus l-Tyrosin durch bakterielle Zersetzung oder Tyrosinasewirkung zu finden hoffte. Ich hatte es für möglich gehalten, das Dioxyphenylalanin, das leicht oxydierbar ist und eine melaninartige Substanz bildet, bei der Umwandlung von l-Tyrosin in Melanin zu isolieren. So beschäftigte ich mich hauptsächlich mit der Synthese des Dioxyphenylalanins. Denselben Gedankengang verfolgte auch der englische Forscher *Raper*², der Tyrosinase aus *Tenebrio molitor* auf Tyrosin in Wasser unter Einleitung von Sauerstoff einwirken ließ und dabei l-3, 4-Dioxyphenylalanin sowie 5, 6-Dioxyindol und 5, 6-Dioxyindol-2-carbonsäure isolieren konnte. Durch diesen Versuch hat die Annahme, daß Adrenalin aus Tyrosin gebildet werden kann, eine starke Stütze erfahren. Auch bei bakteriellen Spaltungen besteht die Möglichkeit, daß das 3, 4-Dioxyphenylalanin als intermediäres Produkt aus l-Tyrosin gebildet wird und daß das leicht oxydierbare Zwischenprodukt dann weiter bis zum Melanin umgewandelt wird. Angeregt durch die Befunde *Rapers* habe ich meine früheren Untersuchungen wieder aufgenommen und mich bemüht, durch Einwirkenlassen von *Proteus vulgaris* auf l-Tyrosin in eiweißfreier Nährlösung das l-3, 4-Dioxyphenylalanin zu gewinnen. Aber bis jetzt bin ich noch nicht in der Lage, über irgendwelche positive Ergebnisse zu berichten.

Experimenteller Teil.

1. Gentisinaldehyd-dimethyläther.

Den Gentisinaldehyd stellte ich nach der Vorschrift von *O. Neubauer* und *L. Flatow*³ aus Salicylaldehyd dar. Zur Methylierung wurden 7,0 g Gentisinaldehyd in 50 ccm 10%iger Natronlauge gelöst und das Dimethylsulfat ganz langsam aus einem Tropftrichter unter ständigem Schütteln

¹ *C. H. Harington*, Biochem. Journ. **20**, 300, 1926; *C. H. Harington* und *G. Barger*, ebendasselbst **21**, 169, 1927.

² *H. S. Raper*, Biochem. Journ. **20**, 735, 1926; **21**, 89, 1927.

³ *O. Neubauer* und *L. Flatow*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **52**, 382, 1907.

zutropfen gelassen. Dabei fand geringe Erwärmung statt. Nach dem Erkalten wurde das Reaktionsgemisch wiederholt mit Äther geschüttelt und aus diesem Ätherauszug der Äther abdestilliert. Der Destillationsrückstand war fast farblos und von öligter Konsistenz. Nach dem Zusatz von 100 ccm Wasser unterwarf ich diese ölige Masse der Wasserdampfdestillation. Das Destillat war anfangs milchig getrübt, aber nach dem Stehenlassen über Nacht im Eisschrank hatten sich schöne farblose Kristalle in langen Nadeln ausgeschieden. Nach dem Absaugen und Trocknen im Vakuumexsikkator über Chlorcalcium betrug die Menge der Kristalle 3,4 g; sie zeigten den richtigen Schmelzpunkt des Gentisinaldehyd-dimethyläthers, nämlich F. 50 bis 51° C.

2. 2, 5-Dimethoxy-benzal-glycinanhydrid.

Die Kondensation des Gentisinaldehyd-dimethyläthers mit Glycinanhydrid erfolgte ebenso wie bei der Synthese des Resorcyalanins¹. 1,5 g Glycinanhydrid und 3,5 g Gentisinaldehyd-dimethyläther wurden fein pulverisiert und im Vakuumexsikkator über Phosphorsäureanhydrid getrocknet. Nach dem Vermischen beider Substanzen in einem Rundkolben wurden noch 2,4 g einmal geschmolzenes, fein pulverisiertes, wasserfreies Natriumacetat und 4,4 g Essigsäureanhydrid zugefügt. Dieses Gemisch wurde in einem 300-ccm-Rundkolben mit Steigrohr während 7 Stunden im Ölbad auf 160 bis 170° C erhitzt. Das Kondensationsprodukt digerierte ich zunächst mit viel Wasser, darauf mit Alkohol; nach dem Trocknen wog die rötlichgelbe Masse 3,1 g, 79,5 % der Theorie entsprechend. Zum Umkristallisieren wurden 1,0 g Kondensationsprodukt in 100 ccm Eisessig heiß gelöst und filtriert. Beim Erkalten schieden sich schöne gelbe Kristalle aus. Die Kristalle wurden scharf abgesaugt und wiederholt mit Wasser gewaschen; nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator über Phosphorsäureanhydrid betrug ihr Gewicht 0,7 g. Der Schmelzpunkt lag bei 278 bis 279° C (unkorrigiert).

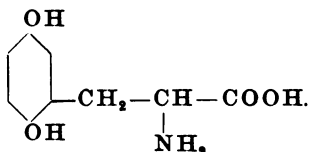
0,1034 g Substanz n/10 NH₃ 5,05 ccm,

0,1168 g „ 0,2749 g CO₂ und 0,0567 g H₂O.

C₂₂H₂₂O₆N₂: Ber.: C 64,36, H 5,44, N 6,83 %;

Gef.: C 64,19, H 5,43, N 6,83 %.

3. Spaltung von 2, 5-Dimethoxy-benzal-glycinanhydrid in d, l-2, 5-Dioxy-phenylalanin.



Die Spaltung des 2, 5-Dimethoxy-benzal-glycinanhydrids erfolgte in derselben Weise wie bei T. Sasaki, und ich bediente mich auch derselben Isolierungsmethode wie im Falle des d, l-Resorcyalanins. 3 g Kondensationsprodukt wurden unter Zusatz von 2 g rotem Phosphor in 20 ccm Jodwasserstoffsäure ($D = 1,7$) gelöst und 8 Stunden lang im Rundkolben

¹ Kinsaburo Hirai, diese Zeitschr. 177, 449, 1926.

unter Rückflußkühlung gekocht. Die resultierende Lösung wurde mit 100 ccm Wasser verdünnt und filtriert. Das klare Filtrat wurde mit 20 ccm Eisessig angesäuert und mit 20 %iger Bleiacetatlösung gefällt. Nach dem Abfiltrieren von Bleijodid wurde das farblose, klare Filtrat mit Ammoniak alkalisch gemacht und der dabei entstandene voluminöse, farblose, amorphe Niederschlag abgesaugt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Der Rückstand samt Filtrierpapier wurde in 450 ccm Wasser fein suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Der überschüssige Schwefelwasserstoff wurde durch einen Kohlensäurestrom verjagt. Nach dem Filtrieren des Bleisulfids wurde die farblose, klare Flüssigkeit unter Kohlensäureeinleiten und unter vermindertem Druck stark bis zur Trockne eingeengt. Der mechanisch aus dem Kolben herausgenommene Rückstand wog nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator über Phosphorsäureanhydrid 1,4 g. Die gesamte Substanz wurde in 15 ccm mit schwefliger Säure versetztem Wasser heiß gelöst und filtriert. Nach dem Stehenlassen im Eisschrank wurden 0,5 g Kristalle erhalten, die zuvor scharf abgesaugt und mit Aceton gewaschen worden waren. Die Substanz war stickstoffhaltig und schmolz bei 203 bis 204° C (unkorrigiert) unter Zersetzung. Sie war schwer löslich in fast allen organischen Lösungsmitteln, nämlich in Alkohol, Aceton, Äther, Chloroform, Benzol und Ligroin, während sie in Wasser sehr leicht löslich war. Die wässrige Lösung reagierte neutral gegen Lackmus und färbte sich bei Zusatz von Ammoniak allmählich schwarz, und bei Zusatz von Eisenchloridlösung schwärzlich-grün.

0,1006 g Substanz n/10 NH_3 5,15 ccm,
0,1162 g „ 0,2337 g CO_2 , 0,0592 g H_2O .

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$: Ber.: C 54,80, H 5,63, N 7,10 %;
Gef.: C 54,85, H 5,69, N 7,16 %.

Über Dopa-Hyperglykämie.

Von

Kinsaburo Hirai und Kumataro Gondo.

(Aus der Kinderklinik der medizinischen Akademie zu Nagasaki.)

(Eingegangen am 24. Juli 1927.)

Mit 12 Abbildungen im Text.

Der eine von uns (*Hirai*)¹ hat über die Synthese der drei Isomeren des Dioxyphenylalanins berichtet, das biochemische Verhalten dieser synthetisch dargestellten Aminosäuren wurde aber unberührt gelassen. Von den biochemischen Eigenschaften dieser Aminosäuren haben wir zuerst den Einfluß derselben auf den Blutzucker bei Tieren untersucht. *Abderhalden*², *Chikano*³ u. a. haben die Beziehungen zwischen verschiedenen Aminosäuren und der Adrenalinwirkung bereits eingehend untersucht. Von besonderem Interesse ist die Feststellung der ausgesprochen hyperglykämischen Wirkung des d, 1-3, 4-Dioxyphenylalanins in der Abhandlung von *Chikano*. Bei unseren Versuchen bestimmten wir vergleichsweise den Blutzucker des Tieres nach Injektion von drei Isomeren des d, 1-Dioxyphenylalanins, nämlich des d, 1-3, 4-, des d, 1-2, 4- und des d, 1-2, 5-Dioxyphenylalanins. Das mit d, 1-3, 4-Dioxyphenylalanin erhaltene Resultat stimmte gut mit den Befunden *Chikanos* überein, während die beiden übrigen, das d, 1-2, 4- und das d, 1-2, 5-Dioxyphenylalanin, auf den Blutzuckergehalt des Versuchstieres fast völlig wirkungslos blieben. Mit d, 1-3, 4-Dioxyphenylalanin stellten wir vier Tierversuche an, indem wir zweimal 0,2 g und zweimal 0,3 g Aminosäure injizierten. Die erreichte Höhe der Hyperglykämie verlief immer der Menge der angewandten Aminosäure parallel; in den letzteren Fällen lag somit das Maximum des Blutzuckergehalts immer höher als in den ersten Versuchen. Zur Kontrolle wurden vier Versuche mit Injektionen von l-Adrenalin ausgeführt; hierbei wurde

¹ Kinsaburo Hirai, diese Zeitschr. 114, 67, 1921; 177, 449, 1926.

² E. Abderhalden und Gellhorn, Pflügers Arch. 206, 154.

³ M. Chikano, Mitt. d. med. Gesellsch. zu Osaka 25, 6, 1926.

der höchste Blutzuckergehalt immer 2 Stunden nach der Injektion festgestellt, während dies bei der Injektion von d, l-3, 4-Dioxyphenylalanin meist nach 3 Stunden der Fall war.

Das verschiedene Verhalten der drei Isomeren des Dioxyphenylalanins in bezug auf den Blutzucker könnte vielleicht so gedeutet werden, daß das d, l-3, 4-Dioxyphenylalanin seiner chemischen Konstitution nach mit dem Adrenalin (3, 4-Dioxyphenyl-äthanol-methylamin) näher verwandt ist als die beiden anderen Verbindungen. Was die Muttersubstanz des Adrenalins anbetrifft, so wurde Tyrosin, Tryptophan, Oxy- und Dioxyphenylserin angenommen. Durch die Auffindung von l-3, 4-Dioxyphenylalanin in *Vicia faba* (Guggenheim¹) und die Bildung derselben Verbindung durch Einwirkung von Tyrosinase auf l-Tyrosin (Raper²), wurde das Vorkommen von Brenzkatechin-aminosäure in der Pflanzenwelt sichergestellt und überdies die Existenz dieser Aminosäure im tierischen Organismus sehr wahrscheinlich gemacht. Bloch³, der die interessante Beziehung einer spezifisch wirkenden tierischen Oxydase zum 3, 4-Dioxyphenylalanin aufgedeckt hat, glaubte, daß das Vorhandensein einer derartigen Brenzkatechin-aminosäure auch im Tierorganismus nicht ausgeschlossen erscheint und daß sie möglicherweise die Muttersubstanz des Adrenalins darstellt. Die allbekannte Tatsache, daß die Haut bei Morbus addisonii durch Hauptpigment stark schwarz verfärbt ist, soll nach Bloch und Löffler⁴ so zu erklären sein, daß die vermutliche Muttersubstanz des Adrenalins bei dieser Krankheit nicht mehr in Adrenalin verwandelt werden kann, weil infolge anatomischer Veränderung der Nebenniere diese nicht mehr zur Ausübung ihrer normalen Funktionen befähigt ist. Diese die Vorstufe des Adrenalins darstellende Substanz zirkuliert im erkrankten Organismus und wird durch die Dopase der Haut unter Pigmentbildung oxydiert. Bei unseren Versuchen ist es auch von Interesse, daß unter den drei Verbindungen von ähnlicher chemischer Struktur nur das d, l-3, 4-Dioxyphenylalanin den Blutzuckergehalt zu erhöhen vermochte, während die beiden anderen, das d, l-2, 4- und das d, l-2, 5-Dioxyphenylalanin fast gar keine Wirkung auf den Blutzuckergehalt ausübten. Wenn wir an die chemische Zusammensetzung des Adrenalins und an die des d, l-3, 4-Dioxyphenylalanins denken, so mag es vielleicht auch möglich sein, daß eine gewisse Beziehung zwischen der Adrenalin- und dieser Dopa-Hyperglykämie besteht. Weitere Versuche mit dem optisch-aktiven 3, 4-Dioxyphenyl-

¹ Guggenheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 276, 1913.

² H. S. Raper, Biochem. Journ. 20, 735, 1926.

³ Bloch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 98, 226, 1916.

⁴ Bloch und Löffler, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 121, 262, 1916.

alanin sind in unserem Laboratorium im Gange; es kann der Fall sein, daß auch beim 3, 4-Dioxyphenylalanin das gleiche Verhältnis obwaltet wie bei der optischen Aktivität des Adrenalin zu seiner physiologischen Wirksamkeit.

Experimenteller Teil.

Die drei Isomeren, das d, 1-3, 4-, das d, 1-2, 4- und das d, 1-2, 5-Dioxyphenylalanin, wurden alle nach der *T. Sasakis*chen Glycinanhydridmethode aus Vanillin, Resorcyaldehyd-dimethyläther bzw. Gentisinaldehyd-dimethyläther dargestellt. Beim Tierversuch wurde die Substanz stets im Trockenschrank bei 100° C getrocknet und sterilisiert, darauf in 10 cm sterilisierter, physiologischer Kochsalzlösung gelöst und in die Bauchwand subkutan injiziert. Bei der Behandlung des Versuchstieres wurden alle Möglichkeiten vermieden, die unabsichtlich eine Hyperglykämie hervorrufen könnten. Das Versuchstier hatte vor jedem Versuch 24 Stunden lang gehungert. Die Blutzuckerbestimmung erfolgte nach der *Bangs*chen Mikromethode. Die Körpertemperatur des Versuchstieres wurde anal gemessen; in fast allen Versuchen hatte die Körpertemperatur die Tendenz zur Abnahme. In jedem Falle suchten wir zwar den Harn zu sammeln, aber es war vergebens; nur beim Versuchstier Nr. 4 (d, 1-3, 4-Dioxyphenylalanin) gelang uns die Harnuntersuchung: der Harn war nicht zuckerhaltig, gab aber positive Diazoreaktion. Es ist bemerkenswert, daß nach Befunden von *L. Hermann*¹ die Diazoreaktion des Harns von Typhuskranken durch das darin enthaltene Homobrenzkatechin verursacht wird.

A. 1-Adrenalin.

Versuch 1.

Kaninchen, 2050 g. 0,2 ccm 0,1%iges 1-Adrenalin subkutan.

	Blutzucker %		Blutzucker %
Nüchtern	0,109	Nach 4 Std.	0,185
Nach 1 Std.	0,242	" 5 "	0,132
" 2 "	0,275	" 6 "	0,103
" 3 "	0,236	" 7 "	0,098



Abb. 1.

¹ *L. Hermann*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 152, 153, 1926.

Versuch 2.

Kaninchen, 1900 g. 0,2 ccm 0,1 %iges 1-Adrenalin subkutan.

	Blutzucker ‰		Blutzucker ‰
Nüchtern	0,118	Nach 4 Std.	0,227
Nach 1 Std.	0,263	" 5 "	0,152
" 2 "	0,291	" 6 "	0,091
" 3 "	0,259	" 7 "	0,118

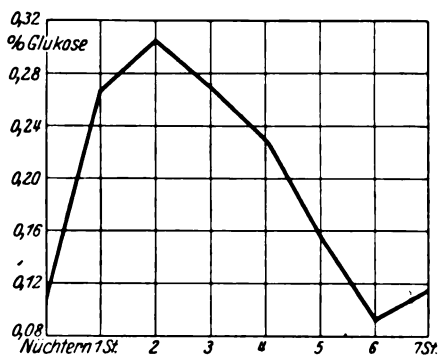


Abb. 2.

Versuch 3.

Kaninchen, 2200 g. 0,3 ccm 0,1 %iges 1-Adrenalin subkutan.

	Blutzucker ‰		Blutzucker ‰
Nüchtern	0,096	Nach 4 Std.	0,175
Nach 1 Std.	0,283	" 5 "	0,115
" 2 "	0,332	" 6 "	0,109
" 3 "	0,298	" 7 "	0,091

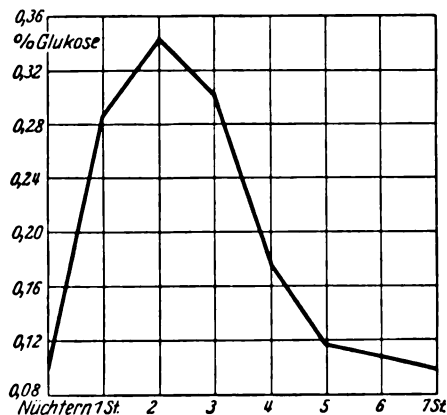


Abb. 3.

Versuch 4.

Kaninchen, 1920 g. 0,3 ccm 0,1 %iges l-Adrenalin subkutan.

	Blutzucker %		Blutzucker %
Nüchtern	0,095	Nach 4 Std.	0,239
Nach 1 Std.	0,274	" 5 "	0,162
" 2 "	0,344	" 6 "	0,102
" 3 "	0,317	" 7 "	0,087

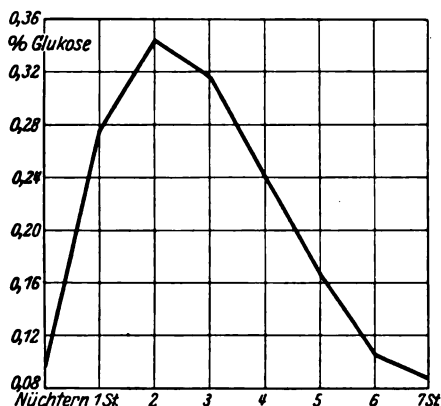


Abb. 4.

B. d, l-3, 4-Dioxyphenylalanin.**Versuch 1.**

Kaninchen, 2140 g. 0,2 g d, l-3, 4-Dioxyphenylalanin subkutan.

	Blutzucker %	Körper- temperatur °C		Blutzucker %	Körper- temperatur °C
Nüchtern	0,098	38,8	Nach 4 Std.	0,139	38,1
Nach 1 Std.	0,124	38,0	" 5 "	0,102	38,1
" 2 "	0,134	38,3	" 6 "	0,087	-
" 3 "	0,161	38,8			

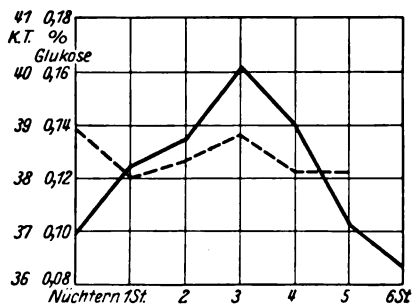


Abb. 5.

Versuch 2.

Kaninchen, 2560 g. 0,2 g d, l-3, 4-Dioxyphenylalanin subkutan.

	Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C		Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C
Nüchtern . .	0,076	39,9	Nach 4 Std.	0,097	38,0
Nach 1 Std.	0,134	39,0	" 5 "	0,101	39,0
" 2 "	0,155	38,6	" 6 "	0,089	
" 3 "	0,120	38,2	" 7 "		38,6

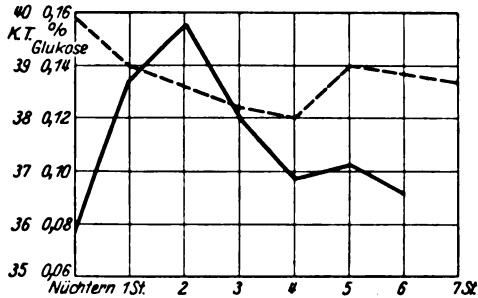


Abb. 6.

— Blutzuckerkurve. --- Körpertemperaturkurve.

Versuch 3.

Kaninchen, 2180 g. 0,3 g d, l-3, 4-Dioxyphenylalanin subkutan.

	Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C		Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C
Nüchtern . .	0,083	39,1	Nach 4 Std.	0,196	37,7
Nach 1 Std.	0,093	38,0	" 5 "	0,156	38,8
" 2 "	0,145	38,8	" 6 "	0,081	38,0
" 3 "	0,199	38,6	" 7 "	0,076	38,1

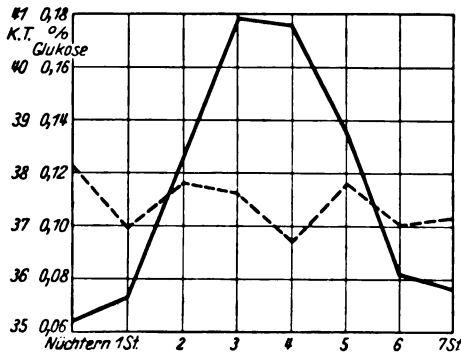


Abb. 7.

— Blutzuckerkurve. --- Körpertemperaturkurve.

Versuch 4.

Kaninchen, 1510 g. 0,3 g d, 1-3, 4-Dioxyphenylalanin subkutan.

	Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C		Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C
Nüchtern . .	0,096	37,8	Nach 4 Std.	0,143	36,9
Nach 1 Std.	0,154	37,7	" 5 "	0,097	37,5
" 2 "	0,191	37,3	" 6 "	0,093	37,6
" 3 "	0,211	36,9			

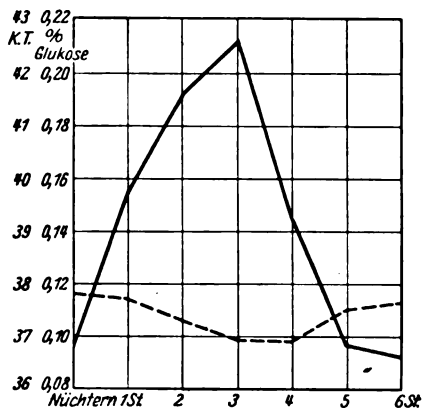


Abb. 8.

— Blutzuckerkurve. --- Körpertemperaturkurve.

C. d, 1-2, 4-Dioxyphenylalanin.

Versuch 1.

Kaninchen, 2160 g. 0,3 g d, 1-2, 4-Dioxyphenylalanin subkutan.

	Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C		Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C
Nüchtern . .	0,089	38,7	Nach 4 Std.	0,103	38,4
Nach 1 Std.	0,085	37,7	" 5 "	0,094	38,5
" 2 "	0,081	37,7	" 6 "	0,094	38,6
" 3 "	0,084	38,4	" 7 "	0,091	38,5

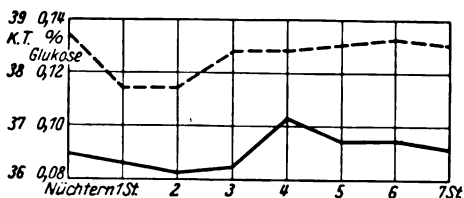


Abb. 9.

— Blutzuckerkurve. --- Körpertemperaturkurve.

Versuch 2.

Kaninchen, 2000 g. 0,3 g d, l-2, 4-Dioxyphenylalanin subkutan.

	Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C		Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C
Nüchtern . .	0,086	38,4	Nach 4 Std.	0,103	38,2
Nach 1 Std.	0,113	38,2	" 5 "	0,094	38,2
" 2 "	0,091	37,5	" 6 "	0,094	38,1
" 3 "	0,098	36,8	" 7 "	0,091	

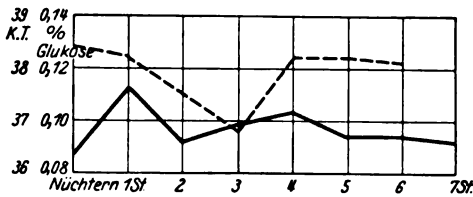


Abb. 10.

— Blutzuckerkurve. --- Körpertemperaturkurve.

D. d, l-2, 5-Dioxyphenylalanin.

Versuch 1.

Kaninchen, 2560 g. 0,3 g d, l-2, 5-Dioxyphenylalanin subkutan.

	Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C		Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C
Nüchtern . .	0,100	39,0	Nach 4 Std.	0,094	38,8
Nach 1 Std.	0,090	38,6	" 5 "	0,097	38,6
" 2 "	0,100	38,5	" 6 "	0,093	38,6
" 3 "	0,099	38,4	" 7 "	0,101	38,8

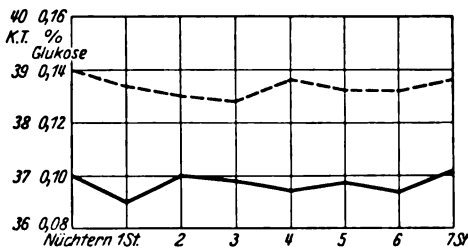


Abb. 11.

— Blutzuckerkurve. --- Körpertemperaturkurve.

Versuch 2.

Kaninchen, 1800 g. 0,3 g d, l-2, 5-Dioxyphenylalanin subkutan.

	Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C		Blutzucker ‰	Körper- temperatur °C
Nüchtern . .	0,114	37,4	Nach 4 Std.	0,118	37,3
Nach 1 Std.	0,120	36,6	" 5 "	0,098	37,3
" 2 "	0,123	37,2	" 6 "	0,105	37,5
" 3 "	0,110	36,8			

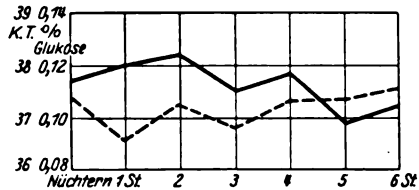


Abb. 12.

— Blutzuckerkurve. --- Körpertemperaturkurve.

Beiträge zur Frage des Hexosenabbaues in der Pflanze.

II. Mitteilung:

Über den Zustand und die Wirksamkeit des Zymaseapparates der Samen.

Von

W. Zaleski und L. Notkina.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium zu Charkow.)

(Eingegangen am 24. Juli 1927.)

Vorliegende Mitteilung stellt eine direkte Fortsetzung der vorigen Arbeit dar und hat den Zweck, den Prozeß der Alkoholgärung der Erbsensamen eingehender zu erforschen, um auf diese Weise Kenntnis über die Beschaffenheit der Zymase, sowie über das Wirkungsvermögen derselben beim Keimen und Reifen der Samen zu erhalten.

Über den Zustand und die Wirksamkeit verschiedener Enzyme während der Keimung und Reifung der Samen haben mehrere Forscher viele Daten berichtet, dennoch sind wir bis jetzt über diese Fragen wenig unterrichtet. Es ist nur festgestellt, daß die Wirksamkeit der meisten Enzyme während der ersten Stadien die Keimung der Samen sehr stark steigert, diese Tatsache kann aber auch in verschiedener Weise gedeutet werden.

Nach einer Ansicht hängt die Steigerung der Wirkung der Enzyme während der Keimung der Samen von der Neubildung derselben ab, nach der anderen handelt es sich in diesem Falle nur um eine Überführung der sogenannten Zymogene oder Profermente in fertige, d. h. aktive Enzyme. Diese Überführung von Fermentstufe in die aktive Form betrachtet man als eine chemische Umwandlung.

Die Annahme der Neubildung der Fermente, wenigstens in den ersten Stadien der Keimung der Samen, sowie die Existenz der Zymogene bleibt bis jetzt unbewiesen, und vielleicht wäre es einfacher, zu vermuten, daß die Steigerung der Enzymwirksamkeit während der Keimung der Samen nur Resultat einer Freilegung der Fermente infolge einer Lockerung adsorptiver Bindungen, sowie einer aktivierenden Wirkung des wechselnden Mediums darstellt. In jedem Falle unterliegt es keinem Zweifel, daß die wichtigsten Enzyme der höheren Pflanzen in einem

fertigen oder in irgend einer Weise gebundenen Zustande bereits in ruhenden Samen vorhanden sind, da sie sich, wie andere Stoffe, beim Reifen derselben ablageren.

Was speziell die Samenzymase betrifft, so sind wir in dieser Beziehung sehr wenig unterrichtet.

*Godlewski*¹ vermutete, daß die Zymase während der Keimung der Erbsensamen nach und nach verbraucht und immer aufs neue gebildet werden muß. Nach der Meinung des Verfassers bildet sich die Zymase auch ohne Sauerstoffzutritt in der Pflanze. Hingegen behauptete *Iwanoff*², daß „die alkoholische Gärung der Erbsen im Gegensatz zu der Hefegärung einer vorherigen O₂-Absorption bedarf“. Zugunsten dieser Annahme spricht die Tatsache, daß das Erbsenmehl in der Luft mehr CO₂ als im Vakuum bildet, während es nach dem ein- bis zweitägigen Aufenthalt in der Luft eine gleiche CO₂-Menge in der Luft und im Vakuum ausscheidet. *Bodnár*³ hat diese Tatsache bestätigt und außerdem nachgewiesen, daß das Erbsenmehl in der Luft auch mehr Alkohol als im Wasserstoff bildet. Nach *Iwanoff* und *Bodnár* spielt der Sauerstoff eine indirekte Rolle bei der Bildung der Erbsenzymase, indem er aus dem Zymasezymogen Zymase frei macht.

Durch diese spärlichen Angaben sind unsere Kenntnisse über den Zustand und die Wirksamkeit der Zymase in ruhenden und keimenden Samen ganz erschöpft.

Beim Studium der oben erwähnten Fragen betreten wir ein unklares Gebiet. Eine außerordentliche Vielheit der unbekannten Größen verschleiert das Wesen des Enzymprozesses und besonders das der Alkoholgärung, die eine Kette ineinandergreifender Teilvorgänge darstellt. Daher müssen wir unsere Aufgabe genauer definieren.

Zuerst stellten wir uns die Aufgabe, die Bedingungen möglichst klar abzugrenzen, unter welchen die Zymase ihre Wirkung voll entfalten kann. Vergleichbare Werte sind nur bei der Konstanthaltung der übrigen Faktoren zu erwarten. Um einen wechselnden und zufälligen Einfluß des Mediums, in dem die Zymase der ruhenden, keimenden und reifenden Samen ihre Wirksamkeit entfaltet, zu übertönen, müssen wir uns der Methode der vergleichenden Aktivierung bedienen. Um die Wirksamkeit der Zymase unserer Objekte optimal zu erhöhen, muß man den Einfluß verschiedener Aktivatoren auf die Alkoholgärung der Erbsensamen prüfen. *Ceteris paribus* hängt die Aktivität der Zymase nicht allein von der relativen Menge oder der Konzentration derselben, sondern auch von ihrem Zustande ab.

Nach diesen vorläufigen Bemerkungen wollen wir zu unseren Versuchen übergehen.

¹ *E. Godlewski* und *F. Polzeniusz*, Extrait du Bull. de l'Academ. d. Sc. de Cracova 1901.

² *L. Iwanoff*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **31**, 1911.

³ *J. Bodnár*, diese Zeitschrift **165**, 145, 1925.

Zu unseren Versuchen haben wir ruhende, keimende und reife Erbsensamen genommen.

Die Keimpflanzen und unreifen Samen wurden bei 30° getrocknet und dann wie die ruhenden Samen fein zermahlen. Das so erhaltene Mehl wurde mit einer entsprechenden Menge destillierten Wassers oder irgend einer Lösung und Toluol (5 bis 8%) gut vermischt, auf dem Boden und den Wänden des Rezipienten in einer dünnen Schicht verteilt und dann auf eine bestimmte Zeit bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank bei 25 bis 30° stehengelassen. Die von den Objekten ausgeschiedene Kohlensäure wurde nach der üblichen Barytmethode bestimmt oder manometrisch gemessen. Um in diesem Falle große Drucke in Gefäßen zu vermeiden, wurden die Manometer oftmals geöffnet und das Quecksilber auf Null gebracht. Selbstverständlich wurde durch diese Methode nicht die absolute CO₂-Menge, sondern nur ihr Überschuß im Vergleich zum aufgenommenen Sauerstoff bestimmt. Dennoch zeigen unsere Objekte eine typische Alkoholgärung, da die $\frac{\text{Alkohol}}{\text{CO}_2}$ -Verhältniszahl mit der der Hefe übereinstimmt. Dank dieser Methode war es möglich, den Verlauf der Alkoholgärung sehr einfach zu verfolgen.

In Vakuumversuchen wurden die Gefäße bis auf 2 bis 3 mm evakuiert und dann luftdicht geschlossen. Nach Verlauf des Versuchs wurden einige Kubikzentimeter verdünnter Schwefelsäure durch den Scheidetrichter in die Gefäße einfließen gelassen, um die gebundene CO₂ frei zu machen. Die von den Objekten ausgeschiedene CO₂ wurde nach der Barytmethode bestimmt.

Zur Alkoholbestimmung wurde eine unter denselben Bedingungen eingestellte Probe, wie zur CO₂-Bestimmung, in einem separaten Rezipienten benutzt.

Zuerst haben wir die CO₂-Ausscheidung und Alkoholbildung des Mehles der unreifen und reifen Samen (mit 100 und 30 Keimprozent) in der Luft und im Vakuum verfolgt.

Zunächst führen wir einen Versuch aus unserer vorigen Arbeit an.

Je 10 g Erbsenmehl + 12 cem Wasser. Versuchsdauer 20 Stunden.
Temperatur 23°.

Samen	In der Luft			Im Vakuum		
	CO ₂ mg	Alkohol mg	Alkohol CO ₂	CO ₂ mg	Alkohol mg	Alkohol CO ₂
Unreife	51.8	51.5	100	32.4	30.0	94
Mit 100 Keimprozent . . .	42.5	40.4	95	30.5	31.4	101
" 30 " . . .	20.5	20.8	100	20.4	20.9	100

Versuch 1.

10 g Erbsenmehl der unreifen Samen + 10 ccm Wasser. Temperatur 22°.

Zeit in Stunden 3 3 12 4 17 3 19 = 61

Manometerstand in mm Hg . 42 42 132 45 90 13 84 = 448

Versuch 2.

10 g Mehl der ruhenden Samen mit 100 Keimprozent + 10 ccm Wasser. Temperatur 22°.

Zeit in Stunden 2 4 18 19 18 = 61

Manometerstand in mm Hg 10 20 90 95 45 = 260

Versuch 3.

20 g Mehl der ruhenden Samen mit 50 Keimprozent + 20 ccm Wasser. Temperatur 22°.

Zeit in Stunden 2 4 18 19 18 = 61

Manometerstand in mm Hg 7 20 54 20 8 = 109

Es erweist sich, daß die Alkoholgärung der unreifen Samen am stärksten und die der schlechten am schwächsten vor sich geht. Diese Tatsache zeigt vor allem, daß die Konzentration der Zymase in den Objekten verschieden war. Mit dem Fortschreiten des Reifens der Samen verschiebt sich das Mengenverhältnis zwischen der Zymase und anderen Stoffen zugunsten derselben, und dadurch nimmt die Konzentration des Fermentes mit dem Alter der Samen ab, obschon die absolute Menge des Enzyms sich vermehren kann. Andererseits nimmt die Wirksamkeit der Zymase parallel mit einer Verminderung und Verlust der Keimfähigkeit der Samen ab. In diesem Falle nimmt also nicht nur Konzentration, sondern auch die Aktivität der Zymase infolge der Zerstörung und Abschwächung derselben ab. In der Tat zeigen unsere Versuche, daß Zymase nur im Verlauf der ersten 24 Stunden ziemlich gleichsam wirkt. Nach Ablauf dieser Zeit nimmt die Geschwindigkeit der Alkoholgärung ab, und das geschieht um so schneller, je schwächer die Energie derselben vom Anfang des Versuchs an war. Daher sehen wir, daß die Geschwindigkeit der Alkoholgärung der unreifen und keimfähigen Samen weit langsamer als die der schlechten Samen abnimmt. Im ersten Falle dauert auch die Alkoholgärung länger.

Es ergab sich weiter, daß die Alkoholgärung des Erbsenmehles wirklich durch Sauerstoff stimuliert wird, da das energisch gärende Mehl der unreifen und keimfähigen Samen in der Luft mehr CO₂ und Alkohol als im Vakuum bildet. Es ist nur wenig verständlich, warum das Mehl der schlechten Samen in der Luft und im Vakuum eine gleiche CO₂- und Alkoholmenge ausscheidet.

Bekanntlich bedarf die Zymase der Hefe zur Entfaltung ihrer Wirkung der sogenannten Cozymase. Wir haben vor kurzem den Befund von *Bodnár* (l. c.) bestätigt, daß zur Wirkung der Erbsenzymase ein Aktivator notwendig ist. Wir haben auch gezeigt, daß das dialysierte inaktiv gewordene Erbsenmehl nicht nur durch Erbsensamenextrakt, sondern auch durch Trockenhefe- und Muskelkochsaft ihre Fähigkeit zur Alkoholgärung zurückgewinnt. Alle diese Extrakte enthalten einen kochbeständigen Stoff, der imstande ist, die unwirksame Zymase in den aktiven Zustand zurückzuführen, oder sie zum wirksamen System zu ergänzen. Zurzeit wissen wir nicht, in welcher Weise dieses Komplement der Zymase in den Fermentvorgang eingreift, und wir können nur sagen, daß zur Einleitung der Alkoholgärung der Erbsensamen ein Aktivator der Zymase oder ihres Zustandes (z. B. des Zymasezymogens) notwendig ist.

Um die Bedeutung dieses Vermittlers der Erbsenzymase in der Alkoholgärung aufzuklären, wurden folgende Versuche angestellt.

Versuch 4.

Je 10 g Erbsenmehl der Samen mit 30 Keimprozent + 10 ccm 1. Wasser, 2. Kochsaft aus 20 g derselben Samen, 3. Kochsaft aus 20 g der gut keimenden Samen, 4. Trockenhefeextrakt¹. Versuchsdauer 19 Stunden. Temperatur 23°.

	Manometerstand in mm Queck- silber
Wasser	30
Extrakt aus denselben Samen . . .	32
" " gut keimfähigen Samen .	43
" " Trockenhefe	130

Versuch 5.

Erbsenmehl + 10 ccm 1. Wasser, 2. Trockenhefeextrakt. Versuchsdauer 19 Stunden. Temperatur 23°.

	Manometerstand in mm Quecksilber		
	Wasser	Trockenhefe- extrakt	Stimulatin ‰
3 g Mehl der unreifen Samen . . .	60	83	39
10 g " " keimfähigen Samen .	95	285	190
10 g " " schlechten Samen . .	30	130	330

¹ Die Bereitung des Trockenhefeextrakts wurde in der vorigen Mitteilung beschrieben.

Die Alkoholgärung der schlechten Samen wird durch Zusatz von Kochsaft derselben fast gar nicht stimuliert. Hingegen steigert der Kochsaft aus den keimfähigen Samen um 35, dieser aus Hefe um 330 % die Alkoholgärung solcher Samen. Es enthalten also die Samen eine zu geringe Menge des Aktivators der Zymase, und daher antworten sie auf den weiteren Zusatz desselben mit einer starken Steigerung der Alkoholgärung. Der Komplementgehalt der unreifen Erbsensamen ist am größten, dieser der schlechten am geringsten.

Die verschiedene Energie der Alkoholgärung der Erbsensamen verschiedener Herkunft hängt also nicht nur von der Menge, Konzentration und Zustand der Zymase, sondern auch von einer Relation zwischen dem Ferment und Komplement desselben ab. Es ist auch möglich, daß Komplement sich ungleich schnell im Verlauf des Prozesses bildet.

Die folgenden Versuche hatten den Zweck, die Wirksamkeit der Zymase während der Keimung der Samen zu verfolgen. Zuerst wollen wir zwei Versuche anführen, die in einer anderen Arbeit unseres Laboratoriums¹ wiedergegeben sind.

Versuch 6.

Der Versuch mit keimfähigen Samen. Keimungstemperatur 14 bis 15°. Je 10 g Mehl der ungekeimten Samen und Keimpflanzen + 12 ccm Wasser. Versuchsdauer 20 Stunden. Temperatur 30°. Luftversuch.

Alter der Keimlinge in Tagen:	0*	1	3	5
CO ₂ in mg	30,0	65,8	50,6	32,8
Alkohol in mg	28,1	60,2	54,0	30,0
Verhältnis $\frac{\text{Alkohol}}{\text{CO}_2}$	93	92	108	94

* Ruhende Samen.

Die in gleichen Zeiten gebildeten CO₂-Mengen verhalten sich wie 1 : 2, 1 : 1, 7 : 1.

Versuch 7.

Der Versuch mit Samen mit 30 Keimprozent. Keimungstemperatur 14 bis 15°. Je 10 g Mehl der ungekeimten Samen und Keimpflanzen + 12 ccm Wasser. Versuchsdauer 20 Stunden. Temperatur 23°.

Alter der Keimlinge in Tagen:	0	1	4-5
CO ₂ in der Luft in mg	12,8	54,2	24,5
CO ₂ im Vacuum „ „	12,5	52,6	23,1

Die in gleichen Zeiten gebildeten CO₂-Mengen verhalten sich wie 1 : 4, 3 : 1,9.

¹ Die Arbeit von W. Zaleski und Olga Pissarjewski.

Versuch 8.

Die Samen mit 50 Keimprozent. Keimungstemperatur 16°. Je 10 g Mehl der ungekeimten Samen und Keimpflanzen + 12 ccm Wasser. Versuchsdauer 20 Stunden. Temperatur 24°. Luft- und Vakuumversuch.

Alter der Keimlinge in Tagen:	0	1	4—5
CO ₂ in der Luft in mg	20,4	61,0	30,8
Alkohol in der Luft in mg.	21,2	62,3	31,0
CO ₂ im Vakuum in mg	20,0	60,2	30,0
Alkohol im Vakuum in mg	21,4	62,5	31,2

Die in gleichen Zeiten gebildeten CO₂-Mengen verhalten sich wie 1 : 3 : 1,5.

Während der Keimung der Erbsensamen steigt die Energie der Alkoholgärung sehr schnell und erreicht bereits nach Verlauf des ersten Tages das Maximum. So bildet das Mehl der eintägigen Keimlinge zwei- bis viermal mehr CO₂ und Alkohol, als das der ruhenden Samen. Nach Erreichen des Maximums nimmt die Energie der Alkoholgärung allmählich ab. Das $\frac{\text{Alkohol}}{\text{CO}_2}$ -Verhältnis stimmt mit der für die alkoholische Gärung charakteristischen Verhältniszahl überein.

Zuerst müssen wir bemerken, daß eine Abnahme der Energie der Alkoholgärung während der Keimung nicht von einer Verminderung der Aktivität der Zymase abhängt. Unsere Versuche mit abgetöteten, aber nicht zermahlenen Objekten geben andere Resultate. Daher wollen wir vorläufig nur den Prozeß der Steigerung der Zymasewirksamkeit während der Keimung der Erbsensamen betrachten.

Nach der oben angeführten Ansicht von *Iwanoff* enthält das Mehl der ungekeimten Samen ein Zymasezymogen, aus dem Sauerstoff Zymase frei macht. Nimmt man diese Ansicht an, so kann man die von uns nachgewiesene Steigerung der Zymasetätigkeit während der Keimung der Erbsensamen als eine Bildung derselben aus ihrem Zymogen betrachten.

Dennoch ist die Ansicht von *Iwanoff* über die Existenz des Zymasezymogens in ruhenden Erbsensamen experimentell nicht begründet. Der Verfasser hat nur festgestellt, daß der Sauerstoff die Alkoholgärung stark stimulieren kann. Worin aber die Wirkung des Sauerstoffs auf die Alkoholgärung besteht, darüber kann man vorläufig nur Vermutungen aussprechen.

Wenn das Erbsenmehl im Vakuum gärt, so müssen wir nach der Ansicht von *Iwanoff* neben dem Zymasezymogen auch das Vorhandensein der freien Zymase annehmen, da diese sich ohne Sauerstoff nicht bilden kann. Es ist selbstverständlich, daß die Zymase sich während des Reifens der Samen bilden muß, und es ist wahrscheinlich, daß sie zuerst als solche entsteht und dann im Form des Zymogens gespeichert

wird. Man konnte daher vermuten, daß die unreifen Samen relativ ärmer am Zymogen und reicher an Zymase als die ruhenden sind. In der Tat haben wir gesehen, daß das Mehl der unreifen Samen stärker als das der ruhenden gärt. Dennoch ist der Unterschied in der CO_2 - und Alkoholbildung in der Luft und im Vakuum im ersten Falle größer, was nicht zugunsten der Ansicht von Iwanoff spricht.

Um diese Frage zu klären, haben wir folgenden Versuch angestellt.

Versuch 9 bis 10.

Die unreifen Erbsensamen wurden zuerst bei 25 bis 30° getrocknet, und dann wurde eine Portion derselben gemahlen, die andere aber auf 24 Stunden an der Luft zur Quellung gebracht. Die Samen keimten sehr gut (100%). Nach beendigten Versuch wurden die Samen getrocknet und gemahlen. Je 5 g Mehl der ungekeimten und gekeimten Samen + 5 ccm Wasser. Versuchsdauer 21 Stunden. Temperatur 22°.

	Manometerstand in mm Quecksilber	
Samen, ungekeimte . .	97	101
„ gekeimte . . .	89	98

Während der Keimung der unreifen Samen finden wir keine Steigerung der Alkoholgärung. Man kann behaupten, daß Zymasezymogen noch nicht vorhanden war, aber wie kann man in diesem Falle die Sauerstoffwirkung auf die Alkoholgärung des Mehles erklären, wenn es in der Luft mehr CO_2 und Alkohol als im Vakuum bildet. Der Sauerstoff stimuliert also die Alkoholgärung des Mehles in einer anderen Weise, als es Iwanoff annimmt.

Zur Lösung unserer Aufgabe müssen wir die Wirkung verschiedener Stimulatoren auf die Alkoholgärung des Mehles der Samen und Keimpflanzen prüfen, um den wechselnden Einfluß des Mediums auszuschalten und den Mechanismus der Stimulation aufzuklären.

Versuch 11.

Je 10 g Mehl der ungekeimten Samen (keimfähigen) und Keimpflanzen + 10 ccm 1. Wasser, 2. Phosphatlösung ($p_H = 8,0$)¹. Versuchsdauer 20 Stunden. Temperatur 20°.

	Manometerstand in mm Quecksilber			
Alter der Keimlinge in Tagen:	0	1	3	5
Wasserportion	64	138	54	27
Phosphatportion	133	181	92	57
Stimulation in %	108	38	74	115

¹ Die Änderung von p_H zwischen 7,0 bis 8,8 übt keinen Einfluß auf die Energie der Alkoholgärung des Erbsenmehles aus. Auch wirken sekundäre Phosphate zwischen 0,5 bis 1% gleich. Zu den Versuchen wurde eine ungefähr 1%ige Natriumphosphatlösung vom p_H (ungefähr) 8,0 benutzt.

Versuch 12.

Je 10 g Mehl der ungekeimten Samen (mit 100 Keimprozent) + 10 ccm Wasser und Methylenblaulösung. Versuchsdauer 20 Stunden.
Temperatur 18°.

	Manometerstand in mm Queck- silber
Wasser	64
Methylenblau, 0,04%ig	90

Versuch 13.

Je 10 g Mehl der ungekeimten Samen (mit 30 Keimprozent) + 10 ccm Wasser, Hydrochinon- und Brenzcatechinelösung. Versuchsdauer 20 Stunden.
Temperatur 20°.

	Manometerstand in mm Queck- silber
Wasser	32
Hydrochinon, 0,1%ig	62
Brenzcatechin, 0,1%ig	63

Versuch 14.

Je 10 g Mehl der ungekeimten Samen + 10 ccm 1. Phosphatlösung,
2. Trockenhefeextrakt. Temperatur 24°. (Samen mit 100 Keimprozent.)

Zeit in Stunden:	Manometerstand in mm Quecksilber				
	3	3	12	3	= 21
Phosphatlösung	30,5	30,8	122,0	30,9	= 214,2
Trockenhefeextrakt	45,1	45,9	189,0	46,4	= 326,4

Versuch 15.

Je 10 g Mehl der eintägigen Keimpflanzen (Samen mit 100 Keimprozent)
+ 10 ccm 1. Phosphatlösung, 2. Trockenhefeextrakt, 3. Wasser.
Temperatur 24°.

Zeit in Stunden:	Manometerstand in mm Quecksilber				
	3	3	12	3	= 21
Wasser	30,4	31,5	121,8	30,8	= 214,5
Phosphatlösung	45,0	45,8	184,1	46,5	= 321,4
Trockenhefeextrakt	47,8	48,0	189,0	48,0	= 332,8

Versuch 16.

Je 10 g Mehl der ungekeimten Samen und eintägigen Keimpflanzen (Samen mit 100 Keimprozent) + 12 ccm Wasser und Trockenhefeextrakt. Versuchsdauer 20 Stunden. Temperatur 30°.

	Wasser		Trockenhefeextrakt	
	CO ₂ in mg	Alkohol in mg	CO ₂ in mg	Alkohol in mg
Ungekeimte Samen	30	—	92	100
Eintägige Keimpflanzen	65,8	60,2	110	120

Zuerst sei bemerkt, daß der Charakter der Wirkung verschiedener Stimulatoren auf die Alkoholgärung des Erbsenmehles verschieden ist. Methylenblau, Hydrochinon und Brenzcatechin stimulieren manchmal die CO₂-Ausscheidung des Mehles, und es scheint, als ob diese Substanzen zufällig wirken. So z. B. steigert Methylenblau die CO₂-Ausscheidung des Mehles der ungekeimten Samen, während es die der gekeimten bald stimuliert, bald nicht. Weiter stimulierten Hydrochinon und Brenzcatechin nur die CO₂-Ausscheidung der Samen mit 30 Keimprozent. Unter anderem vermögen diese Substanzen das Zymasesystem vor angreifenden Fermenten zu schützen. In der Tat hat *Palladin*¹ gezeigt, daß Methylenblau, Hydrochinon und besonders Brenzcatechin die Energie der Proteolyse stark vermindern. Unsere nicht angeführten Versuche zeigen, daß Brenzcatechin nicht nur die Größe, sondern auch die Dauer der CO₂-Ausscheidung steigert. Unter anderem kann auch der Sauerstoff in derselben Weise wirken, da er auch die Energie der Proteolyse vermindern kann².

Hingegen stimulieren sekundäre Phosphate die Alkoholgärung des Erbsenmehles fast in allen Versuchen, und nur das Mehl der unreifen Samen reagiert nicht auf den Zusatz derselben. Allgemein wird das Erbsenmehl um so stärker durch Phosphatzusatz stimuliert, je schwächer es gärt. So z. B. wird die Alkoholgärung des Mehles der ungekeimten Samen um 108 und die der eintägigen Keimpflanzen nur um 38 % gesteigert. Das sehr energisch gärende Mehl der unreifen Samen antwortet gar nicht auf Phosphatzusatz. Wenn das Mehl dieser Samen eine relativ große Menge der anorganischen Phosphate enthält, steht die stimulierende Wirkung der sekundären Phosphate dennoch nicht im direkten Zusammenhang mit der Phosphatmenge der Objekte. Da unsere Objekte anorganische Phosphate enthalten, so ist es wahrscheinlich, daß sekundäre Phosphate hauptsächlich indirekt wirken. Infolge der günstigen Reaktion wird nicht nur die Bildung von Hexose-

¹ W. Palladin, diese Zeitschr. 44, 318, 1912.

² W. Palladin und Kraule, ebendaselbst 39, 290, 1912.

phosphaten stimuliert, wenn eine solche überhaupt stattfindet, sondern auch die Wirksamkeit des Zymaseapparates gesteigert. Außerdem stützen sekundäre Phosphate die Zymase vor Proteasenwirkung. Die stimulierende Wirkung sekundärer Phosphate auf die Alkoholgärung des Erbsenmehles äußert sich im Verlauf des ganzen Prozesses. Daraus kann man schließen, daß die Wirkung der sekundären Phosphate auf die Alkoholgärung des Mehles, hauptsächlich auf die alkalische Reaktion derselben zurückzuführen ist.

Weiter lenken wir unsere besondere Aufmerksamkeit auf die Wirkung des Trockenhefeextraktes auf die Alkoholgärung unserer Objekte.

Der Trockenhefeextrakt stimuliert in allen Versuchen die Alkoholgärung des Erbsenmehles. Auch wird die CO_2 -Ausscheidung des Mehles der unreifen Samen durch Hefeextrakt merklich stimuliert. Wenn nach *Bodnár* (l. c.) die CO_2 -Ausscheidung des Erbsenmehles in der Luft durch Trockenhefeextrakt vermindert wird, so hängt dieses Resultat vermutlich von der zufälligen Qualität der von ihm benutzten Hefe oder Samen ab, da wir niemals eine solche Wirkung des Trockenhefeextraktes auf die Alkoholgärung des Erbsenmehles beobachten konnten.

Der Trockenhefeextrakt steigert die Alkoholgärung des Erbsenmehles stärker als sekundäre Phosphate. Nur die Alkoholgärung des Mehles der eintägigen Keimlinge wird durch Trockenhefeextrakt ebenso stark, wie durch Phosphate stimuliert. Diese Tatsache ist wichtig, da sie klar zeigt, daß der Hefekochsaft auf die Alkoholgärung des Mehles direkt und indirekt wirken kann. Eine indirekte Wirkung des Hefekochsaftes können wir völlig durch Phosphate ersetzen. In diesem Falle wirkt Hefeextrakt gleich Phosphaten als Puffer und Schutzmittel des Zymasystems.

Die spezifische Wirkung des Trockenhefeextraktes auf die Alkoholgärung des Erbsenmehles erklärt sich dadurch, daß dieses einen Aktivator der Zymase enthält, der, wie unsere vorige Mitteilung zeigt, für die Wirksamkeit derselben notwendig ist.

Allgemein, je relativ schwächer das Erbsenmehl gärt, um so mehr wird die Energie der Alkoholgärung desselben durch Hefekochsaft gesteigert. So wird die Alkoholgärung des Mehles der eintägigen Keimlinge durch Trockenhefeextrakt relativ schwächer als die der ungekeimten Samen stimuliert.

Dieser Unterschied in der Wirkung des Hefeextraktes auf die Alkoholgärung des Mehles der ungekeimten Samen und Keimpflanzen erklärt sich nur durch einen verschiedenen Aktivatorgehalt dieser Objekte. Die ungekeimten Samen enthalten eine nicht hinreichende Menge des Aktivators, und daher wird die Alkoholgärung derselben durch weiteren

Zusatz dieses Stoffes, der in Trockenhefeextrakt enthalten ist, stark gesteigert. Hingegen enthält das Mehl der Keimlinge eine hinreichende Menge des Aktivators der Zymase, und diese bedarf zur optimalen Wirksamkeit nur einer passenden Reaktion. Es ist daher verständlich, daß man in diesem Falle nur durch Zusatz von Phosphaten eine so starke Stimulation der Gärung herbeiführen kann, daß der natürliche Aktivator keine weitere Steigerung der Wirkung erzielt. Es ist auch verständlich, daß man durch einen Überschuß an Aktivator die Gärung des Mehles der ungekeimten Samen so stark steigern kann, daß sie der der gekeimten Samen gleich wird.

Dank der Methode der ausgleichenden Aktivierung konnten wir den Unterschied zwischen Energie der Alkoholgärung des Mehles der ruhenden und gekeimten Samen ganz ausgleichen.

Nehmen wir vorläufig an, daß sich dieser Aktivator der Alkoholgärung während der Keimung der Erbsensamen bildet, so ist die Annahme der Neubildung der Zymase sowie die Bildung derselben aus dem Zymasezymogen entbehrlich.

Weiter zeigen unsere Experimente, daß die Alkoholgärung des Erbsenmehles im Verlauf der ersten 24 Stunden mit einer konstanten Geschwindigkeit vor sich geht, da der Umsatz der Zeit proportional ist, und tatsächlich sind die in gleichen Zeiten gebildeten CO_2 -Mengen gleich. Es scheint, als ob die Aktivität der Zymase konstant bleibt und gleichsam wirkt.

Nur mit zunehmender Versuchsdauer findet eine allmähliche Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit statt, die Konstanten werden nach und nach kleiner, ihre Werte fallen ab.

Ein Abklingen der Aktivität der Zymase hängt von einer Reihe der verlangsamenden und schädigenden Einflüsse verschiedener Art ab, die zu einer allmählichen Inaktivierung und Zerstörung des Enzyms führen.

Diese negativen Einflüsse wirken auch von Anfang des Prozesses an, und wenn dieser mit einer konstanten Geschwindigkeit vor sich geht, so müssen wir annehmen, daß im Verlauf des Prozesses auch eine Beschleunigung der Reaktion stattfindet. Die Steigerung der Aktivität der Zymase wird durch die Bildung der Aktivatoren bedingt. Im Verlauf der Reaktion bilden sich also die Aktivatoren der Gärung, und es ist auch nicht ausgeschlossen, daß eine Freilegung der Zymase aus adsorptiven Bedingungen vor sich geht.

Die Steigerung und die Abnahme der Aktivität der Zymase halten die Wage während einer gewissen Zeit, später aber verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der Verminderung der Aktivität, und daher nimmt die Intensität der Gärung allmählich ab. Die alkalisch reagierenden Phosphate und besonders Trockenhefeextrakt beschleunigen

nur die Geschwindigkeit der Reaktion, aber nicht den Verlauf derselben. Vorläufig wollen wir nicht diese Frage eingehender besprechen, da wir die Kinetik der Alkoholgärung des Erbsenmehles nach einer genaueren Methode zu untersuchen gedenken.

Überblickt man unsere *Beobachtungen*, so wird man zu der Ansicht gedrängt, daß die Steigerung der Zymasewirksamkeit während der ersten Stadien der Keimung nicht auf die Neubildung der Zymase oder auf die oxydative Verwandlung des Zymogens in die wirksame Zymase zurückzuführen ist. Die Steigerung der Zymasewirksamkeit während der ersten Stadien der Keimung der Erbsensamen hängt von der Bildung der Aktivatoren ab, unter denen ein noch unbekannter Aktivator der Alkoholgärung der Kohlenhydrate, dessen Eigenschaften wir in früherer Mitteilung beschrieben haben, eine erste Stellung einnimmt.

Über den Stoffwechsel der Netzhaut in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung.

Von
Chichio Tamiya.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 25. Juli 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Ich habe auf Vorschlag von Herrn Warburg den Stoffwechsel der Netzhaut in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung untersucht. Ein geeignetes Versuchstier war das Huhn. Die Netzhaut eines nur wenige Tage bebrüteten Hühnerembryos ist für Stoffwechselmessungen hinreichend schwer. Doch ist die embryonale Netzhaut in den ersten Bebrütungstagen sehr empfindlich und wird bei Stoffwechselmessungen leicht zerschüttelt. Deshalb habe ich als frühestes Stadium Hühnerembryonen nach 8 Bebrütungstagen gewählt (Netzhauttrockengewicht 2 bis 3 mg). Bis zum Tage des Ausschlüpfens hatte ich dann noch 14 Tage zur Verfügung. An jedem dieser Tage wurden Stoffwechselmessungen ausgeführt. Außerdem habe ich den Stoffwechsel von Netzhäuten erwachsener Hühner gemessen, die 1 bis 4 Jahre alt waren. Die Gesamtzahl meiner Stoffwechselmessungen beträgt 69.

Ich beschränkte mich auf die Messung der anaeroben Glykolyse¹ ($Q_M^{N_2}$). Die Werte, die ich für $Q_M^{N_2}$ fand, sind in Tabelle I zusammengestellt, in der die Klammern Messungen verbinden, die sich auf Netzhäute desselben Tieres beziehen. Abb. 1 ist eine graphische Darstellung, die alle Versuche mit embryonaler Netzhaut umfaßt, vom achten Bebrütungstage bis zum Tage des Ausschlüpfens (21. bis 22. Bebrütungstag). Auf der Abszisse sind die Bebrütungstage, auf der Ordinate die Glykolysewerte $Q_M^{N_2}$ aufgetragen.

¹ Multipliziert man $Q_M^{N_2}$ mit 0,004, so erhält man die Milchsäurebildung pro Stunde und Milligramm Netzhaut. Ist beispielsweise $Q_M^{N_2} = 100$, so bildet 1 mg Netzhaut pro Stunde 0,4 mg Milchsäure.

Tabelle I.

Hühnernetzhaut in Hühnerserum. 37,5° C. Gasraum 5% CO₂ in N₂.

Die Zahlen an der Spitze der Stäbe bedeuten die Bebrütungstage.

	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Etwa 1 Jahr alt	Etwa 4 Jahre alt
	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$	$Q_M^{N_2}$
23,4	30,8	41,0	30,6	22,4	53,8	35,4	32,9	40,5	51,1	53,8	78,6	52,3	80,1	90,8	145	82	
43,1	32,9		30,0	29,5	43,5	32,5	28,2	44,6	43,2	59,5		59,9		107	146	76	
36,0			27,6		52,2	37,1	32,3	40,6	46,1	65,2		89,8			90	76	
41,6					47,5	37,6	32,6		49,8	41,8		115			92	77	
						35,2				57,4		89,9			163	110	
						33,5						96,5			142	92	
															147	98	
															106	107	
															133		
															133		
															130		
															138		
															135		

Mittelwerte:

36 | 32 | 41 | 29 | 26 | 49 | 35 | 32 | 42 | 48 | 56 | 79 | 85 | 80 | 99 | 131 | 90

Die Ergebnisse lassen sich etwa folgendermaßen zusammenfassen: Bis zum 17. Bebrütungstage ist $Q_M^{N_2}$ kleiner als 50, was bedeutet, daß bis zu dieser Zeit pro Stunde und Milligramm Netzhaut weniger als 0,2 mg Milchsäure gebildet werden. Vom 17. Bebrütungstage an

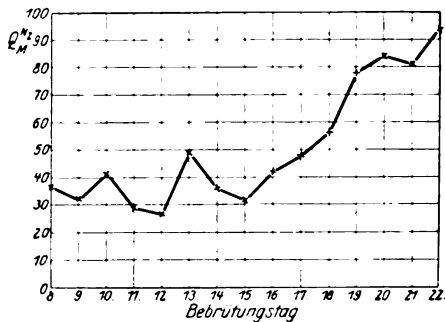


Abb. 1.

Stoffwechsel der embryonalen Netzhaut. $Q_M^{N_2}$ für die Netzhaut des erwachsenen Huhnes war 130 (1 Jahr alt) oder 90 (4 Jahre alt).

bis zum Tage des Ausschlüpfens verdoppelt sich $Q_M^{N_2}$. Am Tage des Ausschlüpfens ist der Quotient rund 100, was bedeutet, daß pro Stunde und Milligramm Netzhaut 0,4 mg Milchsäure gebildet werden. Mit zunehmendem Lebensalter steigt der Quotient weiter und ist nach etwa einem Jahre im Mittel 130, im Höchstfalle 163. Die Netzhaut eines erwachsenen Huhnes bildet pro Stunde und Milligramm bis zu 0,65 mg Milchsäure (65 % ihres eigenen Gewichts an Milchsäure pro Stunde). Wie es scheint, fällt dann $Q_M^{N_2}$ im weiteren Verlauf des Lebens wieder ab (nach 4 Jahren war der Quotient im Mittel 90, im Höchstfalle 110), doch läßt sich dies, da zu wenig Versuche vorliegen, nicht mit Sicherheit sagen.

Versuchsanordnung.

Die Versuchstiere wurden durch Kopfab schneiden getötet, das Präparieren bei möglichst schwachem elektrischen Licht vorgenommen. Die Augen wurden herausgenommen und in 37° warmes Hühnerserum eingetaucht, das mit 5 Vol.-% Kohlensäure und 95 Vol.-% Stickstoff gesättigt war.

Die Augen wurden längs des Äquators aufgeschnitten, die Glaskörper mit einer Pinzette herausgehoben. Dann wurden die Netzhäute mit einem Glaslöffel vom Augengrund sorgfältig losgelöst.

Als Milieu für die Stoffwechselmessungen benutzte ich in Vorversuchen Ringerlösung, überzeugte mich aber bald davon, daß Ringer-

lösung die Netzhaut schädigt, insbesondere die embryonale Netzhaut früher Entwicklungsstadien, deren Stoffwechsel in Ringerlösung schnell auf Null absinkt. Deshalb ging ich zu Serum über, in dem, wie die Protokolle zeigen, der Stoffwechsel der Netzhaut, auch der embryonalen, hinreichend lange konstant bleibt. Das Serum war immer frisches Hühnerserum, das durch Zentrifugieren spontan koagulierten Hühnerbluts gewonnen wurde. (Entnahme aus der Flügelvene oder Carotis.) Der Bicarbonatgehalt wurde jedesmal bestimmt und entsprach 500 bis 600 cmm CO_2 pro Kubikzentimeter Serum. Glucose wurde zugesetzt, und zwar 1 mg pro Kubikzentimeter Serum, das normalerweise 2 mg Glucose pro Kubikzentimeter enthält. Ich bemerke noch, daß nach Versuchen von Dr. H. A. Krebs artfremdes Serum nicht benutzt werden darf, da es den Stoffwechsel durch Schädigung der Zellen erheblich herabdrückt.

Die Messung des Stoffwechsels geschah manometrisch nach den Vorschriften von Warburg für Stoffwechselmessungen in Serum¹.

Protokolle.

Protokoll 1.

Jedes Versuchsgefäß enthält die beiden Netzhäute eines Hühnerembryos (achter Bebrütungstag). Hühnerserum. 37,5°. Gasraum 5% CO_2 in N_2 .

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Volumen des Serums	$v_F = 2 \text{ ccm}$	$v_F = 2 \text{ ccm}$	$v_F = 2 \text{ ccm}$
Volumen des Gasraumes	$v_G = 12,1 \text{ ccm}$	$v_G = 12,2 \text{ ccm}$	$v_G = 11,5 \text{ ccm}$
$k_{\text{CO}_2}^{\text{Ringer}}$	1,18	1,18	1,12
$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M$	0,14	0,14	0,137
$k_{\text{CO}_2}^{\text{Serum}}$	1,46	1,46	1,39
Gewicht der beiden Netzhäute * .	4,01 mg	6,01 mg	4,75 mg
	mm	mm	mm
Druckänderung in 5' . . .	+ 10,0	+ 12,5	+ 12,0
" " 5' . . .	+ 10,0	+ 12,0	+ 11,5
" " 5' . . .	+ 10,0	+ 12,5	+ 12,0
Summa 15' . . .	+ 30 mm = 44 cmm	+ 37 mm = 54 cmm	+ 35,5 mm = 49,5 cmm
	$Q_M^{\text{N}_2} = 43,7$	$Q_M^{\text{N}_2} = 36,0$	$Q_M^{\text{N}_2} = 41,6$

* Trockengewicht.

¹ O. Warburg, Stoffwechsel der Tumoren. Berlin, J. Springer, 1926.

Protokoll 2.

Versuch mit der Netzhaut eines etwa 1 Jahr alten Huhnes. Die Gefäße 1 und 2 enthielten Netzhautstücke des rechten Auges, die Gefäße 3 und 4 Netzhautstücke des linken Auges. 37,5°. Hühnerserum. Gasraum 5% CO₂ in N₂.

	Rechtes Auge		Linkes Auge	
	Gefäß 1	Gefäß 2	Gefäß 3	Gefäß 4
Serumvolumen	$v_F = 2 \text{ ccm}$	$v_F = 2 \text{ ccm}$	$v_F = 2 \text{ ccm}$	$v_F = 2 \text{ ccm}$
Volumen des Gasraumes . .	$v_G = 12,12 \text{ ccm}$	$v_G = 11,58 \text{ ccm}$	$v_G = 11,48 \text{ ccm}$	$v_G = 12,20 \text{ ccm}$
$k_{\text{CO}_2}^{\text{Ringer}}$	1,18	1,13	1,12	1,19
$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M$	0,166	0,163	0,163	0,166
$k_{\text{CO}_2}^{\text{Serum}}$	1,51	1,46	1,45	1,52
Gewicht der Netzhautstücke*	2,74 mg	3,19 mg	1,58 mg	2,21 mg
	mm	mm	mm	mm
Druckänderung in 5' .	+ 20,0	+ 23,5	+ 12,5	+ 16,0
" " 5' .	+ 20,5	+ 25,0	+ 12,5	+ 17,5
" " 5' .	+ 20,0	+ 23,0	+ 12,5	+ 16,0
Summa 15' .	60,5 mm = 91,4 cmm	71,5 mm = 103,7 cmm	37,5 mm = 54 cmm	49,5 mm = 74,8 cmm
	$Q_M^{\text{N}_2} = 133$	$Q_M^{\text{N}_2} = 130$	$Q_M^{\text{N}_2} = 138$	$Q_M^{\text{N}_2} = 135$

* Trockengewicht.

Beiträge zum Problem des Blutzuckers.

VIII. Mitteilung:

Blutzucker- und Phosphorkurve. 6. Adrenalin.

Von

H. K. Barrenscheen, A. Eisler und L. Popper.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 28. Juli 1927.)

In der letzten Mitteilung dieser Reihe¹ konnten wir in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur zeigen, daß Insulin beim Normalen die Phosphorsäureausscheidung durch den Harn wesentlich herabdrückt und auch den Phosphatspiegel im Blut beeinflusst, wenn auch die Wirkung auf das Blutphosphat beim Normalen nicht so deutlich ist, wie z. B. nach Zuckerzufuhr, oder beim Diabetiker. Es war naheliegend, im Zuge dieser Untersuchungen auch das Adrenalin, das ganz allgemein als Antagonist des Insulins im Zuckerstoffwechsel angesehen wird, in den Kreis der Betrachtungen zu ziehen. Wir wollen hier von den Arbeiten absehen, welche den Antagonismus Insulin-Adrenalin auf die Blutzuckerkurve berücksichtigen; beruht doch auf ihnen die therapeutische Anwendung des Adrenalins bei der Insulinvergiftung. Einen weiteren Beitrag zur gegensätzlichen Wirkung dieser beiden Inkrete im Kohlehydratstoffwechsel liefert die Arbeit von *Gottschalk*².

Durch die Untersuchungen von *Neuberg*, *Gottschalk* und *Strauß*³ war gezeigt worden, daß durch Insulin die Acetaldehydbildung überlebenden Lebergewebes um das Mehrfache gesteigert wird. In Verfolg dieser Befunde konnte *Gottschalk* nachweisen, daß Adrenalin die Acetaldehydbildung im Leberbrei hemmt, und daß es durch entsprechende Wahl passender Insulin- und Adrenalinmengen gelingt, die gegensätzliche Wirkung dieser Hormone auf den oxydativen Kohlehydratabbau, gewissermaßen zu neutralisieren. Zu ähnlichen Ergebnissen

¹ Diese Zeitschr. 177, 81, 1926.

² Klin. Wochenschr. Jahrg. 3, S. 1356 bis 1357, 1924.

³ Deutsch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 45; diese Zeitschr. 146, 164, 1924.

gelangte auch von *Issekutz*¹ in Durchströmungsversuchen an der isolierten Kaninchenleber. Insulin hemmte hier die unter Adrenalin verstärkte Säurebildung.

Unsere Untersuchungen bezweckten zunächst den Nachweis, ob sich dieser Antagonismus nicht auch auf den Phosphatstoffwechsel, der mit dem Kohlehydratstoffwechsel in engstem Zusammenhang steht, erstreckt. Weiter hofften wir von Versuchen in dieser Richtung eventuell auch Anhaltspunkte für die theoretische Deutung des initialen Anstiegs der anorganischen Phosphorsäure im Blute nach Kohlehydratzufuhr zu gewinnen.

Eingehende Untersuchungen über die Wirkung des Adrenalins auf die Phosphorsäureausscheidung durch den Harn liegen bisher in der Arbeit von *Sokhey* und *Allen*² vor, welche an Hunden den Nachweis erbringen konnten, daß die Phosphatausscheidung im Harn nach Adrenalininjektion analog wie nach Insulin absinkt. Unsere eigenen Untersuchungen wurden an Kaninchen und an stoffwechselgesunden normalen Studenten ausgeführt. Wir haben das Adrenalin in Versuchen am Menschen intravenös in Mengen von 0,2 mg verabfolgt, subkutan wurde 1 mg injiziert. Die subjektiv unangenehmen Wirkungen der Injektion waren meist nach 2 bis 5 Minuten restlos abgeklungen. Nur in zwei Fällen sahen wir uns genötigt, den Versuch der Nebenerscheinungen wegen abbrechen. Nähere Einzelheiten siehe die angehängten Versuchsprotokolle. In den Versuchen am Menschen wurde auch die Phosphatausscheidung durch den Harn berücksichtigt. Bezüglich der Technik der Blutentnahme und der Bestimmungsmethoden verweisen wir auf die früheren Mitteilungen dieser Reihe³.

Übereinstimmend zeigen sowohl die Tierversuche als die Versuche am Menschen, daß Adrenalin bei subkutaner und auch bei intravenöser Injektion mit der Steigerung des Blutzuckers ein beträchtliches Absinken der anorganischen Phosphorsäure im Blute bedingt. Der gesamt-säurelösliche Phosphor zeigt keine bemerkenswerten Änderungen. Die Phosphatausscheidung im Harn verhält sich auch beim Menschen analog, wie es von *Sokhey* und *Allen* für den Hund beschrieben wurde. Es tritt im Verlauf der ersten Stunden nach der Injektion ein Abfall der Phosphorausscheidung auf, der 50 % und mehr des Ausgangswertes beträgt. Nur in einem Versuch am Kaninchen (s. Versuchsprotokoll, Versuch 3) finden wir 30 Minuten nach der Injektion von 0,4 mg Adrenalin eine beträchtliche Steigerung der anorganischen Phosphorsäure im Blute, die dann freilich von einem starken Abfall gefolgt ist.

¹ Diese Zeitschr. 183, 283 bis 297, 1927.

² Biochem. Journ. 18, 1170, 1924.

³ Diese Zeitschr. 177, 39, 1926 (III. Mitteilung).

Bemerkenswert ist, daß bei einzelnen Versuchen (s. Versuche 3 und 4) die Phosphorsäurekurve im Blute wieder ansteigt, während der Blutzucker noch im Ansteigen ist bzw. beträchtliche hyperglykämische Werte aufweist. Dieses Verhalten steht in einem gewissen Gegensatz zur Phosphorkurve, wie wir sie nach peroraler Glucosezufuhr beschrieben haben. Der tiefste Punkt der P-Kurve liegt dort jenseits des Maximums der Blutzuckerkurve, der Wiederanstieg fällt meist mit der hypoglykämischen Phase der Zuckerkurve zusammen.

Wie ist nun dieses Verhalten der Phosphorkurve im Blute und der Phosphatausscheidung durch den Harn theoretisch zu erklären? *Macleod*¹ setzt sich bei der Besprechung der Ergebnisse von *Sokhey* und *Allen* in seiner Monographie über Insulin und Kohlehydratstoffwechsel etwas ausführlicher mit dieser Frage auseinander und kommt zu dem Schluß, daß Adrenalin und Insulin, wenn sie auch sonst in den Kohlehydratstoffwechsel antagonistisch eingreifen, im Falle des Phosphatstoffwechsels gleichsinnig gerichtet wirken. Durch Adrenalin soll, wie durch Insulin und durch Glucosezufuhr, die gleiche Stufe der Kohlehydrat-Phosphorverbindung im Organismus durchlaufen werden. Zwingend erscheint uns eine derartige Annahme durchaus nicht, vielmehr schien es uns, noch bevor wir von *Macleods* Anschauungen Kenntnis hatten, weitaus wahrscheinlicher, daß hier die primäre Wirkung des Adrenalins im Phosphatstoffwechsel durch die antagonistische Wirkung des Insulins verdrängt wird, wobei die Adrenalinhyperglykämie den Reiz für die vermehrte Tätigkeit des Inselapparates abgeben könnte. Können wir doch auch nach peroraler Glucosezufuhr bei bestehender Hyperglykämie als ersten Ausdruck der Insulinwirkung einen Abfall im anorganischen Phosphor feststellen, während die Wirkung des Insulins auf den Blutzucker, die alimentäre Hypoglykämie, erst zu einem viel späteren Zeitpunkt in Erscheinung tritt. Für diese Annahme, daß die Adrenalinwirkung auf den Phosphatstoffwechsel durch Insulin verdeckt sein könnte, sprachen auch unsere Blutzuckerkurven, welche auch nach Adrenalininjektion eine sehr beträchtliche Hypoglykämie nach der ursprünglichen Hyperglykämie zeigen, eine Erscheinung, die wir bereits in unseren früheren Untersuchungen² als Ausdruck einer vermehrten Tätigkeit des Inselorgans gedeutet haben. Aus dieser Überlegung heraus sind wir nun darauf ausgegangen, das Inselorgan physiologisch so weit festzulegen, daß eine Kompensation der Adrenalinwirkung nicht mehr in vollem Ausmaße erfolgen könne. Zu diesem Zwecke wählten wir die Belastung mit Glucose und injizierten zu einer Zeit, wo wir annehmen konnten, daß der Inselapparat mit der Assimilation

¹ *Macleod*, Kohlehydratstoffwechsel und Insulin. Berlin, Springer, 1927.

² Diese Zeitschr. 177, 27, 1926.

des Zuckers vollauf beschäftigt sei, Adrenalin. Wir haben aus diesem Grunde zunächst am Vortage eine Blutzuckerkurve nach Belastung mit 1 g Glucose pro Kilogramm Körpergewicht aufgenommen und am Versuchstage das Adrenalin zu der Zeit injiziert, zu welcher die Blutzuckerkurve bereits den Abfall auf hypoglykämische Werte zeigte. Tatsächlich zeigt sich nun, daß die Adrenalininjektion unter diesen Bedingungen neben einer Steigerung des Blutzuckers auch mit einer vorübergehenden beträchtlichen Steigerung des anorganischen Phosphors im Blut einhergeht, und daß auch die Phosphorausscheidung im Harn vorübergehend eine deutliche Steigerung erkennen läßt.

Diese Ergebnisse sprechen wohl dafür, daß die Wirkung des Adrenalins auf die anorganische Phosphorsäure im Blute und die Phosphatausscheidung durch den Harn der Insulinwirkung entgegengesetzt ist, unter gewöhnlichen Verhältnissen jedoch durch die gleichzeitig einsetzende antagonistische Tätigkeit des Inselapparates verdeckt wird. Erst die Blockierung des Inselorgans zeigt die wahre Wirkung des Adrenalins¹. Vielleicht wäre hier eine Möglichkeit gegeben, die funktionelle Reserve des Inselapparates zu prüfen. Leider war es uns aus Mangel an entsprechendem Krankenmaterial nicht möglich, diese Gesichtspunkte auf die Untersuchung von Diabetikern anzuwenden.

Zusammenfassung.

1. Nach subkutaner und intravenöser Injektion von Adrenalin sinkt die anorganische Phosphorsäure im Blute ab, die Phosphatausscheidung durch den Harn ist beträchtlich herabgesetzt.

2. Physiologische Inanspruchnahme des Inselapparates durch vorhergehende perorale Glucosezufuhr zeigt, daß jetzt Adrenalin in antagonistischer Weise zum Insulin die Werte des anorganischen Phosphors im Blute und die Phosphatausscheidung im Harn beträchtlich steigert.

Auszug aus den Versuchsprotokollen.

Kaninchenversuche.

Versuch K. 1. 20 Oktober 1926. Kaninchen, weiblich, 2900 g, 24 Stunden nüchtern, 0,3 mg Adrenalin subkutan.

Zeit	Blutzucker mg.-%	Anorganischer Phosphor mg.-%
Nüchtern	165	2,11
30 Min.	252	1,54
60 "	350	1,97

¹ Zu analogen Schlußfolgerungen über die Aktivierung der Inselstätigkeit durch Adrenalin kommen auch *Zunz* und *La Barre* (Ref. Chem. Centralbl. 1927, I, S. 3097). Leider ist aus dem uns allein zur Verfügung stehenden Referat die Versuchsanordnung der Autoren nicht ersichtlich.

Versuch K. 3. 21. Oktober 1926. Kaninchen, männlich, 3150 g, nüchtern, 0,4 ccm Adrenalin subkutan.

Zeit	Blutzucker mg. ^o / _o	Anorganischer Phosphor mg. ^o / _o
Nüchtern	142	4,96
15 Min.	223	4,25
30 "	273	5,57
60 "	320	4,01
90 "	324	3,86
120 "	248	3,19

Versuche am Menschen.

Versuch Nr. 3. 19. November 1926. Med. Hüb., 21 Jahre. 0,2 mg Adrenalin intravenös. Unmittelbar nach der Injektion Zittern, Herzklopfen, Blässe, Schweißausbruch. Nach 5 Minuten Symptome abgeklungen.

Zeit	Zucker mg. ^o / _o	Anorganischer Phosphor mg. ^o / _o	Gesamtsäure- löslicher Phosphor mg. ^o / _o
Ausgangswert	117	2,73	31,5
5 Min.	138	2,43	31,7
12 "	—	2,37	32,6
20 "	144	2,61	30,6
30 "	125	2,61	30,6
60 "	110	2,72	30,8

Versuch Nr. 4. 23. November 1926. Med. Gap., 20 Jahre. 1 ccm Adrenalin subkutan. Nach 2 Minuten schwaches Herzklopfen, sonst ohne Neben-erscheinungen.

Zeit	Zucker mg. ^o / _o	Anorganischer Phosphor mg. ^o / _o
Ausgangswert	115	3,05
5 Min.	132	2,56
12 "	157	2,73
20 "	179	1,97
30 "	180	2,11
60 "	175	2,14

Versuch Nr. 9. 13. Januar 1927. Med. Hüb., 21 Jahre. 1 mg Adrenalin subkutan. Keine Nebenerscheinungen.

Zeit	Zucker mg. ^o / _o	Anorganischer Phosphor mg. ^o / _o	Gesamtsäure- löslicher Phosphor mg. ^o / _o
Ausgangswert	119	4,64	30,0
5 Min.	126	—	—
15 "	146	3,80	32,4
30 "	167	3,46	28,2
45 "	159	3,45	28,2
60 "	160	3,46	32,6
75 "	137	3,41	29,0
90 "	117	4,09	29,4
120 "	105	4,00	28,5

Versuch Nr. 13. 10. Februar 1927. Med. *Krat.*, 21 Jahre alt. 1 ccm Adrenalin subkutan. Keine Nebenerscheinungen.

Zeit	Zucker mg-%	Anorganischer Phosphor mg-%	Gesamtlöslicher Phosphor mg-%	Harn- menge ccm	Stundenportion Phosphor mg
Ausgangswert	100	4,62	26,2	20	14
15 Min. . .	126	4,23	29,7		
30 " . .	163	3,80	26,3		
45 " . .	135	3,73	26,5		
60 " . .	130	3,73	30,1	25	11,6
75 " . .	115	3,88	26,6		
90 " . .	79	3,88	26,6		
120 " . .	72	3,54	25,0	21	8,6
150 " . .	68	3,73	23,7		
180 " . .	68	3,88	25,5	27	10,5

Versuch Nr. 16. Med. *Bad.*, 22 Jahre alt. Vorversuch vom 25. März 1927. 85 g Glucose per os. Typische Hyperglykämiekurve mit hypoglykämischem Abfall nach 90 Minuten. Die Phosphorsäureausscheidung im Harn fällt von 20,7 auf 10,3 mg in der ersten, 9,5 mg in der zweiten, 8,3 mg in der dritten Stunde. Am 26. März. Wiederholung des Versuchs, nach 90 Minuten 1 mg Adrenalin subkutan; auf die Injektion leichtes Herzklopfen, sonst keine Nebenerscheinungen.

Zeit	Zucker mg-%	Anorganischer Phosphor mg-%	Gesamtsäure- lös. Phosphor mg-%	Harn- menge ccm	Stundenportionen	
					Phosphor mg-%	Zucker
Ausgangswert	87	4,02	31,7	56	27,7	0
15 Min. . .	109	5,33	32,7			
30 " . .	137	4,74	31,8			
45 " . .	125	4,05	31,4			
60 " . .	108	3,36	29,6	44	10,3	0
70 " . .	97	3,90	29,6			
90 " . .	104	3,96	32,6			
Nach dieser Entnahme Injektion						
105 Min. . .	145	3,89	31,0			
120 " . .	174	4,86	31,5	50	16,2	1,9%
135 " . .	196	3,85	31,1			
150 " . .	188	3,61	27,5			
180 " . .	137	4,11	31,0	44	10,6	Spuren
210 " . .	95	4,09	28,1			

Zur Kenntnis der Hydroperoxyd spaltenden Eigenschaft der Böden.

Von
K. Scharrer.

(Aus dem Agrikulturchemischen Institut der Hochschule für Landwirtschaft
und Brauerei Weißenstephan bei München.)

(Eingegangen am 28. Juli 1927.)

Die Erscheinung, daß die Böden Hydroperoxyd unter Entwicklung von Sauerstoff zu zerlegen vermögen, beansprucht seit *Saussure* und *Liebig* die Aufmerksamkeit der Forscher (1).

Die Ansichten über die Ursache dieser katalytischen Wirkung der Böden sind sehr verschieden. Stünde diese Bodeneigenschaft in Beziehung zu Faktoren, die die Bodenfruchtbarkeit bestimmen, so wäre die Ermittlung der Größe der Wasserstoffperoxyd spaltenden Kraft der Böden ein relativ einfacher Weg zu ihrer Bewertung. Bei der komplizierten Zusammensetzung der Böden ist es naheliegend, nach mutmaßlichen Zusammenhängen der verschiedensten Bodeneigenschaften mit der katalytischen Kraft zu suchen.

A. Fragestellung und Methodik.

Die eigenen Versuche hatten folgende Fragestellung zur Grundlage:

1. Von welchen physikalischen und chemischen Eigenschaften und Faktoren wird die Größe der katalytischen Kraft des Bodens bestimmt?
2. Wie verändert sich die Größe der katalytischen Fähigkeit des Bodens beim Trocknen, Glühen, Behandeln mit verschiedenen Substanzen, beim Sterilisieren und Bestrahlen?
3. Sind durch die verschiedene Düngung ein und desselben Bodens Änderungen in der Größe der katalytischen Wirksamkeit zu beobachten?
4. Welche Hydroperoxyd zersetzende Kraft zeigen jene Substanzen, die wichtige Bestandteile des Bodens darstellen?

Bekanntlich wird das Katalaseferment chemisch durch die Fähigkeit definiert, aus Wasserstoffperoxyd den Sauerstoff katalytisch in Freiheit zu setzen. Quantitativ wird die Wirksamkeit der Katalase durch die Menge Hydroperoxyd, die sie zersetzt, oder durch die Menge des aus dem Wasserstoffperoxyd frei werdenden Sauerstoffs gemessen. Zur Bestimmung des zersetzten Hydroperoxyds gibt es zwei Verfahren:

1. Die Permanganatmethode beruht darauf, daß H_2O_2 sich mit KMnO_4 in schwefelsaurer Lösung nach der Gleichung $2 \text{KMnO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}_2 + 4 \text{H}_2\text{SO}_4 = 2 \text{K}_2\text{SO}_4 + 2 \text{MnSO}_4 + 8 \text{H}_2\text{O} + 5 \text{O}_2$ umsetzt und ein Überschuß von KMnO_4 die Lösung rot färbt.

2. Die jodometrische Methode nach *Jolles* (2). Dieses Verfahren wurde von *Jolles* im besonderen für die quantitative Bestimmung der Katalase im Blute ausgearbeitet. Ihr Prinzip besteht darin, daß H_2O_2 aus Jodkalium Jod in Freiheit setzt, welches durch Titration mit Thiosulfatlösung quantitativ bestimmt wird.

Die jodometrische Methode erledigt sich bei Böden schon durch ihr Prinzip; denn bei den mannigfaltigen Bestandteilen der Böden wird das in Freiheit gesetzte Jod naturgemäß in Umsetzung gebracht. Das Permanganatverfahren hat bei Böden den Nachteil, daß der Farbumschlag oft äußerst schwierig zu sehen ist, wodurch vorheriges Filtrieren notwendig wird, ein Umstand, der natürlich sehr zur Komplikation der Methode beiträgt, da kolloidreiche Böden das Asbestfilter arg verstopfen. Das wichtigste negative Moment bei dieser Methodik ist aber, daß auch die Böden an und für sich Permanganat beträchtlich entfärben. Macht dieser Umstand dieses Verfahren schon bei Mineralböden, wie eigene Versuche zeigten, ungenau, so wird es bei humosen Böden und insbesondere bei Moorböden völlig unbrauchbar.

Was die Messung der katalytischen Kraft durch die entwickelte Sauerstoffmenge anbelangt, so sind für diese Untersuchung eine Reihe Apparate konstruiert worden. Viel wichtiger als die Frage nach der Einzelheit der Apparatur ist die Art des bei dieser Methodik verwendeten Hydroperoxyds. Es bleibt die Wahl zwischen dem sogenannten Tropen-Wasserstoffperoxyd und dem Wasserstoffperoxyd chemisch rein, absolut säurefrei (*Merck*). Da nun, wie aus den bisherigen Versuchen hervorgeht und durch eigene bestätigt werden konnte, die Größe der katalytischen Kraft des Bodens von dem p_{H} stark abhängt, schien es bedenklich, zur Untersuchung das stark säurehaltige Tropen-Wasserstoffperoxyd zu benutzen. So weist schon *P. Wachtel* (3) mit Recht darauf hin, daß er im Tropen-Hydroperoxyd Phosphorsäure und Salzsäure in großen Mengen, sowie Schwefelsäure in Spuren nachweisen konnte. Auch hiesige Versuche zeigten ähnliches, und daher wurde auch hier das chemisch reine Wasserstoffperoxyd benutzt. Durch Vorversuche konnte festgestellt werden, daß während der meist zur Verwendung gelangenden Zeit von einer Stunde keine wesentliche Änderung des Hydroperoxydtiters gegenüber Permanganat zu verzeichnen ist. Zweckentsprechend bereitet man sich nur so viel 3 %iges Wasserstoffperoxyd, als man für die Bestimmung einer Serie benötigt. Größere Mengen herzustellen, ist unpraktisch, da der Titer in nicht paraffinierten Gläsern rascher abnimmt und daher dann die Möglichkeit zur Feststellung von Vergleichswerten fehlt, während in den paraffinierten Flaschen das Wasserstoffperoxyd, wie Versuche ergaben, seinem Gehalt nach praktisch konstant bleibt.

Die Messung kann entweder so erfolgen, daß die Menge Sauerstoff bestimmt wird, die während einer bestimmten Zeit zur Entwicklung gelangt, oder daß man die Zeit feststellt, während welcher eine bestimmte Menge Sauerstoffgas entbunden wird.

Meist war im nachstehenden so gearbeitet worden, daß 5 g lufttrockener Boden mit 20 ccm 3%iger H_2O_2 genau 1 Stunde behandelt und die entwickelte Menge Sauerstoff gemessen wurde. Da bei ein und derselben Versuchsreihe stets bei gleicher Temperatur und gleichem Druck gemessen wird, erübrigt sich im allgemeinen die Reduktion des Sauerstoffvolumens auf die Normalverhältnisse von Druck und Temperatur, zumal nur die relativen Werte von Wichtigkeit sind. Als Apparatur gelangte die von J. König (4) mit geringen Modifikationen zur Anwendung. Als Absperflüssigkeit wurde 5%ige Natronlauge benutzt, die von Zeit zu Zeit erneuert werden muß. Weil nur mit säurefreiem Wasserstoffperoxyd gearbeitet wurde, genügte diese verdünnte Natronlauge vollkommen zur etwaigen Bindung der durch Spuren Säure aus alkalischen Böden entwickelten Kohlensäure.

B. Die Versuche.

1. Katalytische Kraft und verschiedene Bodeneigenschaften.

Tabelle I.

Katalytische Wirkung und Reaktion der Böden.

Boden Nr.	Reaktion mit HCl	p_H	Entwickelte ccm Sauerstoff	Boden Nr.	Reaktion mit HCl	p_H	Entwickelte ccm Sauerstoff
1	0	3,99	46,4	19	0	3,26	39,0
2	sehr schwach	6,90	184,0	20	sehr schwach	6,23	260,5
3	0	4,18	39,9	21	0	4,48	100,0
4	schwach	4,51	73,7	22	0	5,77	104,4
5	stark	7,22	212,8	23	0	4,25	180,5
6	"	7,22	186,8	24	schwach	6,58	216,0
7	schwach	6,64	217,1	25	Spuren	5,93	186,0
8	0	5,77	192,0	26	schwach	5,67	190,5
9	0	5,37	117,2	27	0	5,45	195,0
10	0	5,00	99,8	28	0	5,52	184,0
11	0	6,20	70,5	29	0	5,49	206,0
12	schwach	6,95	202,3	30	sehr stark	> 7,00	206,0
13	sehr schwach	7,05	243,0	31	sehr schwach	5,98	236,8
14	Spuren	4,63	155,0	32	0	6,31	184,8
15	0	5,07	192,6	33	Spuren	6,02	94,0
16	0	5,17	111,7	34	sehr stark	> 7,00	263,0
17	Spuren	5,67	104,6	35	" "	> 7,00	176,0
18	"	6,57	144,6				

Die Reaktion mit Salzsäure gibt Aufschluß über den Gehalt des Bodens an kohlensaurem Kalk (Tabelle I). Das p_H wurde elektrometrisch im KCl-Auszug ermittelt. Die Werte für die katalytische Kraft des Bodens bedeuten, sofern nicht ausdrücklich andere Mengen angegeben werden, wie schon erwähnt, die Kubikzentimeter Sauerstoff, die von 5 g lufttrockenem Boden bei Behandlung mit 20 ccm 3%iger H_2O_2 während einer Stunde entwickelt wurden. Es wurden immer von jedem Boden mindestens drei Bestimmungen ausgeführt; die angegebenen Werte stellen somit den Durchschnitt dreier Parallelbestimmungen dar. Aus den angeführten Zahlen ist zu ersehen, daß deutliche Zusammenhänge zwischen dem p_H und der katalytischen

Kraft des Bodens bestehen. Dem niedrigsten Wert für p_H 3,99 entspricht der zweitniedrigste Sauerstoffwert. Den höchsten p_H -Werten von 6,95 und 7,22 entsprechen auch die höchsten Sauerstoffwerte. Jedoch ist auch zu ersehen, daß die Werte für die katalytische Kraft keine direkte Funktion der p_H -Zahlen darstellen. Immerhin ist deutlich zu beobachten, daß je saurer der Boden, desto kleiner die Sauerstoffentwicklung ist und umgekehrt.

Die Böden mit hohem Eisen- und Mangangehalt zeigen im allgemeinen eine stärkere Sauerstoffentwicklung als die Böden mit niedrigem Eisen- und Mangangehalt (Tabelle II). Doch besitzen durchaus nicht immer die Böden mit größter Sauerstoffentwicklung auch den höchsten Gehalt an Eisen und Mangan. Böden mit geringem p_H -Gehalt zeigen bei annähernd gleichem Eisen- und Mangangehalt eine geringere Sauerstoffentwicklung als Böden mit höherem p_H . Ebenso wie das p_H ist also der Eisen- und Mangangehalt der Böden offenbar zwar ein sehr wichtiger, aber kein ausschlaggebender Faktor für die Größe der katalytischen Kraft des Bodens, schon deshalb, weil die Gesamtmenge an Eisen und Mangan natürlich kein direktes Maß ist für den Gehalt an kolloiden Eisen- und Manganoxiden, die hauptsächlich die katalytische Wirkung zu verursachen scheinen.

Tabelle II.

Katalytische Wirkung und Gehalt an Eisen und Mangan.

Boden Nr.	p_H	Fe_2O_3 + Al_2O_3 %	Mn_2O_4 %	Entwickelte cem Sauerstoff
1	3,99	1,42	0,091	46,9
2	6,90	4,44	0,405	184,0
3	4,18	1,10	0,087	39,9
4	4,51	1,47	0,153	73,7
5	7,22	3,91	0,532	212,8
6	7,22	3,35	0,370	186,8
7	6,64	33,00	2,347	217,1
8	5,77	7,50	1,125	192,0
9	5,37	1,20	0,115	117,2
10	5,00	5,81	0,263	99,8
11	6,20	10,47	0,567	70,5
12	6,95	10,86	1,168	202,3
13	7,05	8,35	0,543	243,0
14	4,63	7,98	0,634	155,0
15	5,07	5,04	0,542	192,6
16	5,17	1,37	0,058	111,7
17	5,67	1,98	0,264	104,6
19	3,26	0,278	0,011	39,0
20	6,23	6,96	0,711	260,5
21	4,48	11,65	0,451	100,0
22	5,77	9,13	0,494	104,4
23	4,25	23,11	0,901	180,5
24	6,58	6,29	0,140	216,0
25	5,93	6,54	0,365	186,0
26	5,67	6,36	0,335	190,5
27	5,45	6,83	0,370	195,0
28	5,52	6,48	0,593	184,0
29	5,49	6,37	0,350	206,0
31	5,98	8,00	0,537	236,8

Tabelle III.

Katalytische Wirkung und Glühverlust der Böden.

Boden Nr.	Glühverlust %	Entwickelte ccm Sauerstoff	p_{H}	Boden Nr.	Glühverlust %	Entwickelte ccm Sauerstoff	p_{H}
1	5,38	46,4	3,99	19	96,50	39,0	3,26
2	4,53	184,0	6,90	20	73,80	260,5	6,23
3	3,62	39,9	4,18	21	4,28	100,0	4,48
4	0,73	73,7	4,51	22	15,09	104,4	5,77
5	19,34	212,8	7,22	23	24,07	180,5	4,25
6	19,12	186,8	7,22	24	6,21	216,0	6,58
7	44,96	217,1	6,64	25	6,33	186,0	5,93
8	6,73	192,0	5,77	26	6,30	190,5	5,67
9	85,60	117,2	5,37	27	6,58	195,0	5,45
10	16,85	99,8	5,00	28	6,66	184,0	5,52
11	6,49	70,5	6,20	29	6,71	206,0	5,49
12	10,78	202,3	6,95	30	20,92	206,0	>7,00
13	19,39	243,0	7,05	31	63,49	236,8	5,98
14	10,39	155,0	4,63	32	7,30	184,8	6,31
15	6,25	192,6	5,07	33	7,08	94,0	6,02
16	3,46	111,7	5,17	34	18,85	263,0	>7,00
17	2,54	104,6	5,67	35	70,91	176,0	>7,00

Der Glühverlust, der ein ungefähres Maß für die Carbonate und Humussubstanzen des Bodens darstellt, steht, wie aus den angegebenen Zahlen der Tabelle III hervorgeht, nur insofern mit der katalytischen Kraft des Bodens im Zusammenhang, als da, wo er eine Funktion des Gehalts an Carbonaten und damit des Kalkgehalts des Bodens ist, auch die katalytische Kraft des Bodens zunimmt. Auch in jenen Fällen, wo der Glühverlust durch die organische Substanz des Bodens bedingt wird, hat er manchmal höhere katalytische Werte im Gefolge. Von einem sonstigen Zusammenhang zwischen Glühverlust und katalytischer Kraft kann aber nicht gesprochen werden. So sieht man z. B., daß Boden Nr. 9 zwar einen sehr hohen Glühverlust aufweist (Hochmoorboden), daß aber seine katalytische Kraft viel geringer ist als bei Boden Nr. 7 (Niedermoorboden), der einen viel geringeren Glühverlust zeigt. Andere Faktoren, vor allem das p_{H} , wirken dabei mit und verhindern, daß man aus dem Glühverlust allein ein einheitliches Bild gewinnt.

Das Gesamtcalcium (4) wurde in dem mit heißer konzentrierter Salzsäure behandelten Boden bestimmt, das in Chlorammonium lösliche Calcium nach der Vorschrift von D. Meyer (5) (Tabelle IV). Höheren Werten für den Gesamtkalk entsprechen im allgemeinen höhere katalytische Werte. Doch ist der Zusammenhang durchaus kein proportionaler, sondern zeigt vielfach Abweichungen. Ähnlich steht es mit dem Zusammenhang zwischen dem in Chlorammon löslichen Calcium und der katalytischen Kraft.

Die niedrigsten Zahlen für die Hydroperoxyd spaltende Eigenschaft ergaben die Grobsande (Tabelle V). Die feineren Sande zeigten schon höhere Werte, noch höhere die sandigen Lehme, besonders die mit hohem p_{H} . Die Humusböden Nr. 5 und 7, beide stark alkalisch, ergaben die größte Sauerstoffentwicklung, während der saure Moorboden (Nr. 9) trotz seines hohen Gehalts an organischer Substanz dagegen relativ zurücksteht.

Tabelle IV.

Calciumgehalt und katalytische Wirkung der Böden.

Boden Nr.	Gesamt- Ca O %	Mg O %	NH ₄ Cl-lösliches Ca O %	Entwickelte ccm Sauerstoff	pH
1	0,044	0,010	—	46,4	3,99
2	0,250	0,015	0,178	184,0	6,90
3	0,050	0,080	0,023	39,9	4,18
4	0,065	0,104	0,019	73,7	4,51
5	4,230	0,534	—	212,8	7,22
6	3,750	0,230	—	186,8	7,22
8	0,310	0,022	0,233	192,0	5,77
9	1,780	0,180	—	117,2	6,37
10	0,252	0,150	0,178	99,8	5,00
11	0,260	0,104	0,227	70,5	6,20
12	0,370	0,092	0,300	202,3	6,95
13	2,560	0,532	—	243,0	7,05
14	0,063	0,044	—	155,0	4,63
15	0,073	0,029	—	192,6	5,07
16	0,085	0,040	0,065	111,7	5,17
17	0,104	0,027	0,080	104,6	5,67
18	0,140	0,190	—	144,6	6,57
19	0,055	0,031	—	39,0	4,26
20	2,030	0,110	—	260,5	6,23
21	0,090	0,058	0,075	100,0	4,48
22	0,196	0,099	0,150	104,4	5,77
23	0,091	0,061	0,125	180,5	4,25
24	0,261	0,105	—	216,0	6,58
25	0,190	0,102	—	186,0	5,93
26	0,176	0,153	—	190,5	5,67
27	0,170	0,090	—	195,0	5,45
28	0,181	0,110	—	184,0	5,52
29	0,165	0,100	—	205,0	5,49
30	11,610	2,390	—	206,0	> 7,00
31	3,180	0,532	—	236,8	5,98
32	0,321	0,199	—	184,8	6,31
33	0,180	0,046	—	94,0	6,02
34	4,370	0,879	—	263,0	> 7,00
35	5,260	0,212	—	176,0	> 7,00

Die Bestimmung des Tongehalts (Tabelle VI) erfolgte nach der Methode *Schlösing* in folgender Weise:

5 g Feinerde werden in einer Porzellanschale mit einigen Tropfen Wasser zu einem dicken Brei zerrieben (10 bis 15 Minuten). Dann spült man alles vorsichtig in ein Becherglas und gibt einige Tropfen verdünnter HCl (1 : 3) bis zur schwach sauren Reaktion hinzu. Hierauf wird kurze Zeit erwärmt, nach dem Erkalten filtriert und mit destilliertem Wasser ausgewaschen, bis zur Entfernung der sauren Reaktion (bis also das Waschwasser ganz schwach sauer reagiert, aber ohne daß Trübung entsteht). Der Filtrerrückstand wird quantitativ in die bereitgestellten Standzylinder übergespült, Ammoniak zugegeben, bis die Lösung schwach alkalisch ist, durchgeschüttelt und nach 24 Stunden abgehebert. Dann wird mit Wasser aufgerührt und wieder nach 24 Stunden abgehebert. Dies wird so lange fortgesetzt, bis die abgeheberte Flüssigkeit klar bleibt (nach etwa 3 Wochen).

Tabelle V.

Bodenart und katalytische Wirkung.

Boden Nr.	pH	Entwickelte ccm Sauerstoff	Klassifikation der Böden
1	3,99	46,4	Sandiger Grobsand
2	6,90	184,0	Lehmiger Sand
3	4,18	39,9	Sandiger Grobsand
4	4,51	73,7	Sand
5	7,22	212,8	Humusboden
6	7,22	186,8	"
7	6,64	217,1	"
8	5,77	192,0	Sandiger Lehm
9	5,37	117,2	Moorboden
10	5,00	99,8	Schwach grobsandiger, sandiger Lehm
11	6,20	70,5	Sandiger Lehm
12	6,95	202,3	Schwach sandiger, toniger Lehm
13	7,05	243,0	Sandiger Kies
14	4,63	155,0	Schwach lehmhaltiger Sand
15	5,07	192,6	Tonhaltiger Lehm Boden
16	5,17	111,7	Stark grobsandiger Feinsand
17	5,67	104,6	Viel feinsandhaltiger Sand
18	6,57	144,6	Grobsandhaltiger Feinsand
19	3,26	39,0	Hochmoorboden
20	6,23	260,5	Niederungsmoorboden
21	4,48	100,0	Grobsandiges, stark steinhaltiges Material
22	5,77	104,4	Tonhaltiger Feinsand
23	4,25	180,5	Stark tonhaltiger Feinsand
24	6,58	216,0	" " Lehm
25	5,93	186,0	" " "
26	5,67	190,5	" " "
27	5,45	195,0	" " "
28	5,52	184,0	" " "
29	5,49	205,0	" " "
30	> 7,00	206,0	Stark anmooriger Schotterboden
31	5,98	236,8	Niedermoorboden
32	6,31	184,8	Stark sandhaltiger Lehm
33	6,02	94,0	" " Kies
34	> 7,00	263,0	Niedermoorboden
35	> 7,00	176,0	"

Das Abgeheberte sammelt man in einem großen Becherglas und gibt einige Tropfen HCl zur Ausfällung des Tones hinzu. Wenn das Becherglas voll geworden ist, gießt man die überstehende Lösung ab und fügt eventuell noch einige Tropfen HCl hinzu, bis der ganze Ton als Gel ausgefällt ist. Von diesem Ton wird die überstehende Lösung am Schluß möglichst abgegossen, hierauf der Ton in eine Porzellanschale gespült, im Wasserbad eingedampft, in einer Quarzschale getrocknet und nach dem Trocknen bis zur Gewichtskonstanz schwach geglüht.

Die Bestimmung beruht darauf, daß der von absorbierten Basen befreite Ton ein negativ geladenes Kolloid ist und daher durch Ammoniumhydroxyd, das negative Hydroxylionen bei der elektrolytischen Dissoziation abspaltet, im Solzustand erhalten (peptisiert) wird, während die positive Wasserstoffionen abspaltende Salzsäure den Ton zur Ausflockung bringt.

Tabelle VI.

Tongehalt der Böden und katalytische Wirkung.

Boden Nr.	pH	Tongehalt % (Kolloidbestandteile)	Entwickelte ccm Sauerstoff	Boden Nr.	pH	Tongehalt % (Kolloidbestandteile)	Entwickelte ccm Sauerstoff
1	3,99	1,98	46,4	10	5,00	4,28	99,8
2	6,90	3,57	184,0	11	6,20	5,86	70,5
3	4,18	1,12	39,9	12	6,95	6,13	202,3
4	4,51	1,08	73,7	24	6,58	12,24	216,0
5	7,22	2,30	212,8	25	5,93	12,81	186,0
6	7,22	2,34	186,8	26	5,67	12,70	190,5
7	6,64	1,62	217,1	27	5,45	12,74	195,0
8	5,77	5,67	192,0	28	5,52	13,16	184,0
9	5,37	1,80	117,2	29	5,49	12,64	206,0

Tabelle VII.

Mechanische Zusammensetzung einiger Böden und katalytische Wirkung.

Boden Nr.	% Sand 2—0,1 mm	% Feinsand 0,1—0,05 %	% Staub 0,05—0,01 mm	% Feinstes < 0,01	Entwickelte ccm Sauerstoff	pH
13	48,00	14,00	13,50	24,50	243,0	7,05
14	37,40	14,00	19,80	28,80	155,0	4,63
15	32,80	13,20	28,90	25,60	192,6	5,07
16	80,30	7,40	5,40	6,90	111,7	5,17
17	65,50	13,10	11,80	9,60	104,6	5,67
18	88,50	6,20	2,80	2,50	144,6	6,57
21	81,70	5,30	4,00	9,00	100,0	4,48
22	41,30	10,10	15,70	32,90	104,4	5,77
23	17,20	18,40	36,50	27,90	180,5	4,25
30	33,20	16,40	27,60	22,80	206,0	> 7,00
32	43,20	8,60	23,40	24,80	184,8	6,31
33	48,70	11,40	18,80	21,10	94,0	6,02
35	39,10	16,40	22,20	22,30	176,0	> 7,00

Die mechanische Zusammensetzung der Böden in Tabelle VII wurde auf Grund der Schlämmanalyse nach *Kopecky* (6) ermittelt.

Die Schlußfolgerung von *H. Kappen* und *P. Wachtel* (3) aus ihren Versuchen, daß die wesentlichen katalytischen Bestandteile des Bodens seine Tonkolloide sind, wobei die Basizität des Bodens, insbesondere sein natürlicher Kalkgehalt, die katalytische Wirkung fördert, Azidität des Bodens sie hemmt, wird also durch obige Zahlen weitgehend bestätigt.

Unter Hygroskopizität eines Bodens verstehen bekanntlich *H. Rodewald* und *A. Mitscherlich* (7) die Wassermenge, welche der

Boden enthält, wenn seine Oberfläche, also die Summe der Oberflächen der einzelnen Bodenpartikelchen, mit einer Moleküllschicht Wasser bedeckt ist, bezogen auf hundert Gewichtsteile des trockenen Bodens. Die Hygroskopizität ist also eine der Bodenoberfläche proportionale Größe. Da nun die Bodenoberfläche ein für den einzelnen Boden typischer und gleichbleibender Ausdruck ist, durch welche viele landwirtschaftlich wichtige physikalische Eigenschaften mitbedingt werden, ist die Hygroskopizität eine wichtige Bodenkostante.

Die Bestimmung der Hygroskopizität wurde nach der von J. König (4) beschriebenen Apparatur vorgenommen.

Tabelle VIII.

Hygroskopizität und katalytische Wirkung.

Boden Nr.	Hygroskopizität %	p_H	Entwickelte ccm Sauerstoff	Boden Nr.	Hygroskopizität %	p_H	Entwickelte ccm Sauerstoff
13	4,05	7,05	243,0	22	2,17	5,77	104,4
14	2,36	4,63	155,0	23	5,93	4,25	180,5
15	2,03	5,07	192,6	30	2,61	>7,00	206,0
16	0,669	5,17	111,7	31	7,12	5,98	236,8
17	0,864	5,67	104,6	32	2,41	6,31	184,8
18	0,982	6,57	144,6	33	1,83	6,02	94,0
19	8,73	3,26	39,0	34	2,61	7,00	263,0
20	2,55	6,23	260,5	35	8,18	7,00	176,0
21	11,42	4,48	100,0				

Tabelle IX.

Chemische Zusammensetzung und katalytischer Wert elf typischer Böden Bayerns.

Bodenart	Ca O %	Mg O %	K ₂ O %	P ₂ O ₅ %	N %	p_H	Entw. ccm Sauerstoff
Schotterboden von Hollern	2,560	0,532	0,285	0,112	0,319	7,05	243,0
Glimmerschiefer von Raumetengrün	0,063	0,044	0,331	0,178	0,294	4,63	155,0
Quartärlehm von Pettenbrunn	0,073	0,029	0,389	0,110	0,194	5,07	192,6
Burgsandsteinverwitterungsboden von Büchelberg	0,085	0,040	0,055	0,090	0,111	5,17	111,7
Buntsandstein von Sendelbach	0,104	0,027	0,097	0,069	0,108	5,67	104,6
Miocänsand von Vötting	0,140	0,190	0,102	0,064	0,046	6,57	144,6
Hochmoor von Bernau (Chiemsee)	0,055	0,031	0,043	0,075	1,110	3,26	39,0
Niederungsmoor v. Pulling	2,030	0,110	0,101	0,110	2,180	6,23	260,5
Granitboden von Aipolen	0,090	0,058	0,349	0,075	0,038	4,48	100,0
Gneisverwitterungsboden v. Passau	0,196	0,099	0,400	0,209	0,261	5,77	104,4
Basalt vom Kreuzberg	0,091	0,061	0,209	0,070	0,546	4,25	180,5

Tabelle X. Katalytischer Wert der Schlammprodukte verschiedener Böden.

Bodenart	Fraktion	Korngröße	Entwickelte ccm Sauerstoff		
			des lufttrockenen Produktes	des auf dem Wasserbad ge- trockneten Pro- duktes	des auf dem Wasserbad ein- gedampften und geglühten Pro- duktes
Miocänsand	Feinboden ur- sprünglich		5,0 g 144,6 ccm		
	a) Sand	2,00—0,10	5,0 g 153,0 "	5,0 g 97,5 ccm	
	b) Feinsand	0,10—0,05	5,0 g 141,5 "	5,0 g 41,4 "	
	c) Staub	0,05—0,01	1,7 g 146,0 "	2,5 g 107,6 "	
Granitboden	Feinboden ur- sprünglich		5,0 g 100,0 ccm		
	a) Sand	2,00—0,10	5,0 g 85,9 "	5,5 g 79,8 ccm	
	b) Feinsand	0,10—0,05	5,0 g 180,6 "	2,5 g 76,6 "	
	c) Staub	0,05—0,01	3,4 g 130,8 "	2,0 g 55,8 "	
Schotterboden	Feinboden ur- sprünglich		5,0 g 243,0 ccm		
	a) Sand	2,00—0,10	5,0 g 182,0 "	5,0 g 186,1 ccm	5,0 g 170,4 ccm
	b) Feinsand	0,10—0,05	5,0 g 212,0 "	5,0 g 235,2 "	5,0 g 219,3 "
	c) Staub	0,05—0,01	5,0 g 244,8 "	5,0 g 232,1 "	5,0 g 55,8 "
Basalt von Kreuzberg	Feinboden ur- sprünglich		5,0 g 180,5 ccm		
	a) Sand	2,00—0,10		5,0 g 170,4 ccm	155,7 ccm
	b) Feinsand	0,10—0,05		5,0 g 83,0 "	129,4 "
	c) Staub	0,05—0,01		5,0 g 38,6 "	73,1 "
Granitverwite- rungsboden von Passau	Feinboden ur- sprünglich		5,0 g 104,4 ccm		
	a) Sand	2,00—0,10	5,0 g 41,1 "	5,0 g 40,4 ccm	56,6 ccm
	b) Feinsand	0,10—0,05	5,0 g 82,0 "	5,0 g 53,4 "	51,6 "
	c) Staub	0,05—0,01	5,0 g 62,8 "	5,0 g 51,7 "	61,3 "
Glimmer- schieferver- witterungs- boden	Feinboden ur- sprünglich		5,0 g 155,0 ccm		
	a) Sand	2,00—0,10	5,0 g	5,0 g 39,0 ccm	5,0 g 54,6 ccm
	b) Feinsand	0,10—0,05		5,0 g 73,0 "	5,0 g 110,6 "
	c) Staub	0,05—0,01	5,0 g	5,0 g 48,5 "	5,0 g 62,8 "
Burgsandstein- verwitterungs- boden vom Büchelberg	Feinboden ur- sprünglich		5,0 g 111,7 ccm		
	a) Sand	2,00—0,10	5,0 g 39,2 "	5,0 g 35,2 ccm	5,0 g 38,0 ccm
	b) Feinsand	0,10—0,05	0,6 g 51,6 "	3,4 g 62,7 "	3,8 g 92,0 "
	c) Staub	0,05—0,01	0,7 g 48,4 "	3,1 g 77,5 "	2,3 g 50,5 "
Quartärlehm aus Petten- brunn	Feinboden ur- sprünglich		5,0 g 192,6 ccm		
	a) Sand	2,00—0,10		5,0 g 87,8 ccm	
	b) Feinsand	0,10—0,05		5,0 g 170,0 "	
	c) Staub	0,05—0,01		5,0 g 79,2 "	
Buntsandstein von Sendel- bach	Feinboden ur- sprünglich		5,0 g 104,6 ccm		
	a) Sand	2,00—0,10	5,0 g 35,8 "	5,0 g 36,4 ccm	
	b) Feinsand	0,10—0,05	5,0 g 230,1 "	5,0 g 44,5 "	
	c) Staub	0,05—0,01	5,0 g 207,8 "	5,0 g 65,6 "	

Zwischen der Hygroskopizität und der Wasserstoffperoxyd spaltenden Eigenschaft der Böden lassen sich, wie Tabelle VIII erkennen läßt, demnach wenig Beziehungen erkennen, eine Schlußfolgerung, die ähnlich bereits von *Smolik* (9) auf Grund seiner Versuche ausgesprochen wurde.

Um zu verfolgen, welche katalytischen Werte die einzelnen Korngrößen eines Bodens aufweisen, wurden eine Reihe typischer bayerischer Böden, deren Zusammensetzung und katalytische Wirkung Tabelle IX wiedergibt, im Apparat von *Kopecky* (6) geschlämmt. Die einzelnen Schlämmpunkte wurden teils an der Luft, teils auf dem Wasserbade getrocknet und dann die katalytische Kraft der einzelnen Korngrößen untersucht (Tabelle X).

Bei den einzelnen mechanischen Fraktionen der Feinböden zeigen somit fast allgemein die gröberen Bestandteile eine geringere katalytische Kraft als die feineren.

2. Die Änderung der Größe der katalytischen Kraft bei Behandeln der Böden mit verschiedenen Stoffen.

Für die Frage, ob die katalytische Kraft des Bodens durch anorganische oder organische Faktoren hervorgerufen wird, bildet deren Änderung beim Trocknen, Glühen und Sterilisieren bzw. Behandeln mit verschiedenen Agenzien ein wichtiges Kriterium. Die bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiet lauten ziemlich widerspruchsvoll. Während z. B. *König* (8) und Mitarbeiter ein Zurückgehen der katalytischen Kraft durch Behandeln mit Kaliumcyanid bemerken konnten, fand

Tabelle XI.

Die katalytische Kraft der Böden bei Behandlung mit Kaliumcyanid.

Bodenart	Entwickelte ccm Sauerstoff			
	des ursprünglichen Feinbodens	des mit n/500 KCN behandelten Bodens	des mit n/250 KCN behandelten Bodens	des mit n/20 KCN behandelten Bodens
Miocänsand	144,6	227,9	164,4	160,0
Granitboden	100,0	183,1	164,6	172,0
Schotterboden	243,0	240,0	243,6	264,0
Basaltboden	180,5	189,4	—	—
Granitverwitterungsboden . .	104,4	123,2	130,6	167,0
Glimmerschieferboden . . .	155,0	176,6	—	—
Burgsandsteinverwitterungsboden	111,7	119,6	—	—
Quartärlehm	192,6	213,2	—	—
Buntsandstein	104,6	125,3	—	—
Schwerer Lehm Boden	165,5	170,5	203,0	210,0
Hochmoorboden	39,0	57,5	84,5	68,5

Tabelle XII.
Die Änderung der katalytischen Kraft der Böden beim Behandeln mit verschiedenen Stoffen.

Bodenart	Behandlungsart	Entwickelte cem Sauerstoff..	Bodenart	Behandlungsart	Entwickelte cem Sauerstoff
Schotterboden (Hollem)	Ursprünglich	243,0	Granitverwitterungs- boden (Passau)	Ursprünglich	104,4
	Wasserfrei	186,0		Wasserfrei	43,4
	Gegläht	33,6		Gegläht	38,0
	500 cem 2% Phenol	262,0		500 cem 2% Phenol	121,0
	500 " n/100 Ba Cl ₂	275,2		500 " 2% HCHO	119,0
	500 " n/100 K Cl	280,0		500 " n/100 K Cl	119,5
	500 " n/100 HCHO	271,0		500 " n/100 Ba Cl ₂	129,0
	500 " n/100 Na ₂ SO ₄	252,0		500 " n/100 Hg Cl ₂	62,5
	500 " n/100 NaOH	246,0		500 " n/100 Na ₂ SO ₄	123,5
	500 " n/100 HCl	247,5		500 " n/100 AlCl ₃	105,5
	500 " n/100 NH ₃	235,8		500 " n/100 NaOH	183,0
	500 " n/100 AlCl ₃	105,5		500 " n/100 HCl	90,0
				500 " n/100 NH ₃	132,0
Granitboden (Alpolen)	Ursprünglich	100,0	Miocänsand	Ursprünglich	144,6
	Wasserfrei	63,0		Wasserfrei	93,0
	Gegläht	34,0		500 cem 2% Phenol	170,5
	500 cem 2% Phenol	142,0		500 " 2% HCHO	160,0
	500 " n/100 Ba Cl ₂	132,0		500 " 2% Hg Cl ₂	119,5
	500 " n/100 K Cl	120,0		500 " n/100 K Cl	140,0
	500 " 2% HCHO	122,5		500 " n/100 Ba Cl ₂	165,0
	500 " n/100 Na ₂ SO ₄	120,5		500 " n/100 Na ₂ SO ₄	214,0
	500 " n/100 AlCl ₃	93,5		500 " n/100 AlCl ₃	116,0
	500 " n/100 NaOH	225,5		500 " n/100 NaOH	186,5
	500 " n/100 HCl	88,0		500 " n/100 HCl	126,0
	500 " n/100 NH ₃	141,0		500 " n/100 NH ₃	135,0

im Gegensatz dazu *P. Wachtel* (3), daß Kaliumcyanid die katalytische Wirkung des Bodens auf Wasserstoffperoxyd ganz bedeutend förderte.

Bei den eigenen Versuchen mit Kaliumcyanid wurde folgendermaßen gearbeitet: Der zu untersuchende Boden wurde mit 500 ccm n/500 KCN-Lösung behandelt, scharf abgesaugt und mit Wasser erschöpfend nachgewaschen. Der lufttrockene Boden wurde dann auf seine katalytische Kraft untersucht. In der gleichen Weise wurden die Böden mit konzentrierteren KCN-Lösungen (n/250 bzw. n/20 KCN) behandelt.

Wie aus vorstehender Tabelle XI hervorgeht, war dabei meistens ein Ansteigen der katalytischen Wirkung des Bodens zu beobachten. Der Grund liegt wohl darin, daß infolge Hydrolyse die wässrige Lösung des Cyankaliums alkalisch reagiert und die vom Boden festgehaltenen Hydroxylionen die Erhöhung der katalytischen Kraft bedingen.

Die Änderung der katalytischen Kraft der Böden durch Säuren, Basen, verschiedene Salze und organische Stoffe gibt Tabelle XII wieder.

Wie aus diesen Zahlen hervorgeht, erhöhten manche der zugeführten Agenzien die katalytische Kraft des Bodens. Erniedrigend wirkte die zugeführte Salzsäure auf den Granitboden von Aipolen, ebenso wie bei dem Granitverwitterungsboden Passau und dem Miocänsand, nicht erniedrigend beim Schotterboden aus Hollern. Auffallend ist, daß das Aluminiumchlorid beim Miocänsand, beim Granitboden aus Aipolen, besonders aber beim Schotterboden Hollern das katalytische Vermögen bedeutend verringerte. Der Grund ist leicht zu finden: Infolge Hydrolyse reagiert das AlCl_3 sauer und die vorherrschenden Wasserstoffionen bewirken, wie man auch am Beispiel der Salzsäure sieht, ein starkes Zurückgehen der katalytischen Eigenschaft. Außerordentlich erniedrigend auf letztere Größe zeigte sich beim Granitverwitterungsboden Passau und beim Miocänsand auch das Sublimat, wobei die Ursache weniger in der durch diesen Stoff verursachten Abtötung der Bakterien gelegen sein dürfte, als vielmehr in der durch ihn hervorgerufenen vermehrten Azidität infolge der hydrolytischen Aufspaltung dieser Substanz. Erhöhend auf die katalytische Kraft, meist sogar sehr bedeutend, wirkte die Natronlauge; je alkalischer die Reaktion, desto größer mithin die katalytische Kraft.

Den Einfluß von Methylalkohol, Kupfersulfat und Aceton auf die katalytische Kraft des Bodens zeigen die Resultate der Tabelle XIII.

Tabelle XIII.

Behandeln einiger Mineralböden mit verschiedenen Agenzien.

Bodenart	Entwickelte ccm Sauerstoff			
	des ursprünglichen Bodens	des mit CuSO_4 behandelten Bodens	des mit CH_3OH behandelten Bodens	des mit Aceton behandelten Bodens
Granitboden von Aipolen . .	100,0	66,0	115,5	93,0
Schotterboden von Hollern .	243,0	220,0	251,0	232,0
Miocänsand	144,6	85,0	147,5	123,0
Granitverwitterungsböden von Passau	104,5	84,0	111,0	103,0

Aceton bewirkte nur eine geringe Senkung der katalytischen Kraft, Methylalkohol eine Erhöhung, während CuSO_4 , wohl infolge der durch Hydrolyse bedingten sauren Reaktion, eine Verringerung hervorrief.

Inwiefern durch Trocknen und Glühen des ursprünglichen luft-trockenen Bodens eine Änderung der Hydroperoxyd spaltenden Eigenschaft der Böden erzielt wird, zeigt Tabelle XIV.

Tabelle XIV.

Änderung der Hydroperoxyd spaltenden Kraft der Böden durch Trocknen und Glühen.

Boden Nr.	Entwickelte Menge Sauerstoff			Fe_2O_3 + Al_2O_3 o/o	Mn_2O_4 o/o	pH	Glühverlust
	des ursprünglichen Bodens	nach dem Trocknen b. 100–105°	nach dem Glühen				
1	46,4	29,0	25,0	—	—	3,99	5,38
2	184,0	73,5	59,0	4,44	2,40	6,90	4,53
3	39,9	27,0	27,0	1,10	0,70	4,18	3,62
4	73,7	46,0	27,5	0,47	0,85	4,51	6,73
5	212,8	77,5	72,0	3,91	1,26	7,22	19,34
6	186,8	110,0	82,8	—	—	7,22	19,12
7	217,1	198,0	168,2	33,00	4,45	6,64	44,96
8	192,0	92,0	36,2	7,59	2,72	5,77	6,73
9	117,2	65,5	27,0	1,20	1,11	5,37	85,69
10	99,8	79,0	39,0	5,81	1,44	5,00	16,85
11	70,5	55,5	27,7	10,47	1,24	6,20	6,49
12	202,3	122,0	51,0	10,86	1,16	6,95	10,78
32	184,8	77,0	34,3	12,04	0,942	6,31	7,30
33	94,0	58,2	29,0	8,82	0,536	6,62	7,08

Die Größe der katalytischen Kraft des Bodens wurde durch Trocknen und Glühen bei den untersuchten Böden verringert, wobei die Stärke der Abnahme ganz verschieden ist. Daß aber nach dem Glühen überhaupt noch eine katalytische Kraft vorhanden war, beweist, daß die anorganischen Katalysatoren einen wesentlichen Bestandteil der Ursachen der katalytischen Wirkung ausmachen. In einigen Fällen tritt aber, wie später (Tabelle XVIII) gezeigt werden wird, durch den Glühprozeß eine Erhöhung der katalytischen Kraft gegenüber der getrockneten Substanz ein. Besonders lehrreich ist in dieser Hinsicht ein Versuch mit Humussäure. Zur Verwendung kam „Huminsäure“ (Acidum huminicum) der Firma *Merck*, Darmstadt, die nach den Angaben der Firma aus Pflanzenresten dargestellt wird.

Die Substanz ist reich an Eisenverbindungen. Beim Glühen entstehen daher Eisenoxyde, die die hohe katalytische Kraft des Glühprodukts bedingen.

Tabelle XV.

Huminsäure in ihrem katalytischen Wert vor und nach dem Glühen.

	Ursprünglich	Getrocknet	Geglüht
Huminsäure (Acidum huminicum) der Firma <i>Merck</i>	0	0	218,2 cem Sauerstoff

Der Unterschied in der katalytischen Wirkung zwischen ursprünglichem, wasserfreiem (durch erzielte Gewichtskonstanz bei 100° bewirkt) und geglühtem bzw. im Dampftopf sterilisiertem Boden ersieht man aus der Tabelle XVI und XVII.

Tabelle XVI.

Katalytische Kraft von wasserfreien, gekochten, sterilisierten und geglühten Böden.

Bodenart	Entwickelte cem Sauerstoff				
	ursprünglich	wasserfrei	geglüht	sterilisiert*	mit Wasser gekocht
Granitverwitterungsboden von Passau	104,5	43,4	38,0	41,5	55,5
Schotterboden von Hollern	243,0	186,0	33,6	232,5	279,5
Granitboden von Aipolen .	100,0	63,0	29,0	75,5	96,0
Buntsandstein von Sendelbach	104,6	54,0	30,0	51,5	77,0
Quartärlehm aus Pettenbrunn	192,6	93,0	49,0	90,5	172,0
Burgsandsteinverwitterungsboden von Büchelberg	111,5	42,0	28,5	42,5	78,0
Glimmerschiefer von Raumetengrün	155,0	70,5	38,0	50,9	104,0
Basalt von Kreuzberg . .	180,5	84,0	51,0	57,0	126,0
Miocänsand	144,6	93,0	—	120,0	—

 * Sterilisiert wurde dreimal $3\frac{1}{4}$ Stunden bei 100°.

Bei diesen Böden bewirkte also das Glühen eine ganz bedeutende Erniedrigung der katalytischen Wirkung des Bodens, und auch bereits beim Trocknen war die Verminderung ganz beträchtlich.

Durch Sterilisieren nahm das Zersetzungsvermögen gegenüber Hydroperoxyd durchgängig ab. Meist ist die Größenordnung dieser Verminderung ähnlich wie bei der entsprechenden wasserfreien Substanz.

Tabelle XVII.

Bodenart	Behandlungsart	Entwickelte ccm Sauerstoff
Boden vom Kalischlag (ungedüngt)	Lufttrockener Boden	216,0
	Getrocknet bei 100°	109,0
	Geglüht	37,5
	3 mal $\frac{3}{4}$ Std. sterilisiert bei 100°	181,0
	Sterilisiert 3 Std. bei 160°	138,8
Boden vom Kalischlag (Grunddüngung)	Lufttrockener Boden	186,0
	Getrocknet bei 100°	87,5
	Geglüht	35,0
	3 mal $\frac{3}{4}$ Std. sterilisiert bei 100°	129,8
	Sterilisiert 3 Std. bei 160°	89,5
Boden vom Kalischlag (Kainitdüngung)	Lufttrockener Boden	190,5
	Getrocknet bei 100°	96,5
	Geglüht	31,0
	3 mal $\frac{3}{4}$ Std. sterilisiert bei 100°	129,0
	Sterilisiert 3 Std. bei 160°	101,0
Boden vom Kalischlag (Düngung mit 40 % Kalisalz)	Lufttrockener Boden	195,0
	Getrocknet bei 100°	99,0
	Geglüht	29,5
	3 mal $\frac{3}{4}$ Std. sterilisiert bei 100°	107,0
	Sterilisiert 3 Std. bei 160°	96,0
Boden vom Kalischlag (Chlorkaliumdüngung)	Lufttrockener Boden	184,0
	Getrocknet bei 100°	76,5
	Geglüht	32,5
	3 mal $\frac{3}{4}$ Std. sterilisiert bei 100°	134,0
	Sterilisiert 3 Std. bei 160°	103,0
Boden vom Kalischlag (Düngung mit Kaliumsulfat)	Lufttrockener Boden	206,0
	Getrocknet bei 100°	92,0
	Geglüht	33,0
	3 mal $\frac{3}{4}$ Std. sterilisiert bei 100°	163,6
	Sterilisiert 3 Std. bei 160°	99,5

Sehr interessant liegen die Verhältnisse bei den Moorböden (siehe Tabelle XVIII).

Tabelle XVIII.

Katalytische Kraft sterilisierter Moorböden.

Bodenart	Entwickelte ccm Sauerstoff					pH
	des luft- trockenen Bodens	des wasser- freien Bodens	des ge- kochten Bodens	des ge- glühten Bodens	des steri- lisierten Bodens	
Hochmoorboden vom Chiemsee	45,0	27,8	44,5	39,0	27,5	3,26
Niederungsmoorboden v. Pulling	262,0	48,5	109,0	260,5	55,5	6,23
Stark anmooriger Schotterboden	206,0	56,0	—	122,0	—	>7,00
Niedermoorboden	236,0	46,0	—	76,5	—	5,98
Niedermoorwiese I	263,0	64,0	—	127,0	—	>7,00
Niedermoorwiese II	176,0	58,5	—	125,0	—	>7,00

Fällt schon die hohe katalytische Kraft des allerdings neutralen Niedermoorbodens auf, so überrascht außerordentlich die starke katalytische Wirkung des geglühten Bodens. Im Gegensatz hierzu steht die geringe Wasserstoffperoxyd spaltende Kraft des stark sauren Hochmoorbodens, obwohl auch hier der Glührückstand fast das gleiche katalytische Vermögen zeigt, wie der ursprüngliche Boden. Es liegen hier Verhältnisse vor, die stark an die bei der Huminsäure (*Acidum huminicum*) geschilderten erinnern, wo auch der Glührückstand von höherer katalytischer Kraft war als das ursprüngliche Produkt. Dies ist wohl so zu erklären, daß die sauren Produkte beim Glühen zerstört werden und die entstehende, an Eisenoxyd reiche Humusasche eine hohe katalytische Wirkung hat.

Um die etwaige Änderung der Hydroperoxyd spaltenden Kraft eines Bodens durch Bestrahlung zu studieren, wurden verschiedene Böden einerseits der Sonnenbestrahlung, andererseits den Strahlen der Quarzlampe¹ ausgesetzt (Tabelle XIX).

Tabelle XIX.

Änderung der katalytischen Kraft durch Bestrahlung.

Bodenart	Art der Behandlung	Entwickelte ccm Sauerstoff
Miocänsand	Lufttrocken	163,0
	5 ^b im direkten Sonnenlicht	168,0
	9	116,0
	5' Quarzlampe bestrahlt	91,5
	10	87,0
	20	116,0
	40	122,0
	80	117,5
Boden Nr. 8	Lufttrocken	223,0
	5 ^b im direkten Sonnenlicht	228,5
	9	215,5
	5' Quarzlampe bestrahlt	227,0
	10	219,0
	20	225,0
	40	213,0
	80	225,0
Kaliboden Nr. 5	Lufttrocken	213,0
	5 ^b im direkten Sonnenlicht	208,0
	9	186,0
	5' Quarzlampe bestrahlt	181,5
	10	185,0
	20	202,0
	40	181,9
	80	181,0

Die Wirkung der Bestrahlung war somit sehr verschieden. Während beim Miocänsand und beim Kaliboden eine deutliche Abnahme der katalyti-

¹ Herrn Prof. Dr. Bleyer, Weihenstephan, wird auch an dieser Stelle für die Erlaubnis zur Benutzung der Quarzlampe seines Instituts der ergebenste Dank ausgesprochen.

schen Wirkung durch die Bestrahlung zu erzielen war, veränderte sich diese Bodeneigenschaft beim Boden Nr. 8 unter den gleichen Umständen kaum.

3. Düngung der Böden und katalytische Kraft.

Der Einfluß der Düngung auf die katalytische Wirkung des Bodens war der Gegenstand weiterer Versuche (Tabelle XX).

Tabelle XX.

Katalytische Kraft einiger mit Stickstoff und Jod gedüngten Böden.

Düngung	Entwickelte ccm Sauerstoff
Grunddüngung (Gr.)	189,7
Gr. + Natronsalpeter	172,2
Gr. + Chilesalpeter	176,8
Gr. + Natronsalpeter + 0,03 % J	162,7
Gr. + " + 0,09 % J	161,3
Gr. + " + 0,2 % J	160,4
Gr. + " + 0,3 % J	171,4
Gr. + Chilesalpeter + 0,03 % J	168,5
Gr. + " + 0,09 % J	168,2
Gr. + " + 0,2 % J	163,3
Gr. + " + 0,3 % J	154,6

Als Grunddüngung waren 150 kg P_2O_5 und 160 kg K_2O je ha verabreicht worden, und zwar die Phosphorsäure als Rhenaniaphosphat, das Kali als 40%iges Kalisalz. Der Stickstoff wurde in einer Höhe von 132 kg je ha als Natron- bzw. Chilesalpeter gegeben. Der Durchschnitt der jeweiligen Gaben an Natronsalpeter und Chilesalpeter belief sich demnach auf 837 kg je ha. Auf diese 837 kg Natron- bzw. Chilesalpeter sind die Prozente der Jodzufuhr zu beziehen. Es kam somit an Jod in Form von $NaJO_3$ zur Anwendung:

Bei 0,03 % J	0,251 kg J je ha
„ 0,09 % J	0,753 „ J „ „
„ 0,2 % J	1,674 „ J „ „
„ 0,3 % J	2,511 „ J „ „

Die Zahl der Kontrollparzellen war fünf pro Düngungsart; die oben angegebenen Werte sind die Durchschnittsergebnisse je fünf dieser Kontrollparzellen.

Wie die angegebenen Zahlen erkennen lassen, nimmt durch die Stickstoff- und Joddüngung der katalytische Wert des Bodens etwas ab, möglicherweise verursacht durch die allerdings geringe Verschlammung und Verkrustung des Bodens durch das Natrium und die dadurch bewirkte Verminderung der Bakterientätigkeit.

Um etwaige Einblicke zu bekommen in die Zusammenhänge zwischen katalytischer Wirksamkeit des Bodens und Jodgehalt einiger Böden, sei noch im Anschluß an die vorigen Tabellen folgende Übersicht gegeben (Tabelle XXI).

Tabelle XXI.

Katalytische Kraft einiger Böden und deren Jodgehalt¹.

	HCl-lösl. J %	HCl-unlösl. J %	Entwickelte ccm Sauerstoff
Grunddüngung	35	390	180,8
Gr. + Chilesalpeter	47	600	176,5
Gr. + " + 0,03 % J	60	340	168,5
Gr. + " + 0,09 % J	45	450	168,2
Gr. + " + 0,2 % J	34	440	163,3
Gr. + " + 0,3 % J	103	380	154,6
Gr. + Natronsalpeter	23	250	171,2
Gr. + " + 0,03 % J	35	340	160,2
Gr. + " + 0,09 % J	30	340	162,3
Gr. + " + 0,2 % J	42	530	160,4
Gr. + " + 0,3 % J	215	440	171,4

Wesentliche Zusammenhänge zwischen Jodgehalt und katalytischer Kraft des Bodens sind nicht zu konstatieren, doch zeigte die Grunddüngung die höchste katalytische Kraft und mit der Joddüngung erfolgte eine ganz schwache Verringerung, ausgenommen die Parzellen „Natronsalpeter + 0,3 % J“, die einen ebenso hohen katalytischen Wert zeigte als Gr. + Natronsalpeter allein. Alles in allem sind die Unterschiede so gering, daß von prinzipiellen Differenzen nicht gesprochen werden kann.

Tabelle XXII.

Katalytische Kraft einiger mit Stickstoff gedüngten Böden.

Düngung	pH	Entwickelte ccm Sauerstoff
Grunddüngung	5,76	154,7
Gr. + Ammonsulfat	5,61	128,8
Gr. + Natronsalpeter	6,15	172,8
Gr. + Kalksalpeter	6,07	169,7
Gr. + Kalkstickstoff	6,62	200,7

Tabelle XXII zeigt die Wirkung verschiedener Stickstoffdüngemittel auf die Wasserstoffperoxyd spaltende Wirkung des Bodens.

Diese Böden wurden seit 10 Jahren mit verschiedenen Mengen Stickstoff, aber immer mit den gleichen, in obigem Düngungsschema wiedergegebenen Stickstoffformen gedüngt, und zwar im Jahre 1926 mit 40 kg N je ha.

Die Ergebnisse der Tabelle XXII zeigen, daß die Größe der katalytischen Kraft von der durch die Düngung bewirkten Verschiebung der Bodenreaktion abhängig ist.

Tabelle XXIII veranschaulicht die Zusammenhänge zwischen Kalidüngung und katalytischer Wirkung.

Die hierbei verwendeten Kaliböden stammen von einem zwölfjährigen Kalidüngungsversuch, bei dem im Laufe dieser Jahre folgendermaßen gedüngt worden war:

¹ Vgl. hierzu auch K. Scharrer und J. Schwaibold, diese Zeitschr. 185, 405, 1927.

Zeit	kg N je ha	kg P ₂ O ₅ je ha	kg K ₂ O je ha	
1913/14	30 kg als Ammonsulfat	72 kg als Superphos.	100 kg	In den vier verschiedenen Formen
1914/15	45 " " Chilesalpeter	72 " " "	100 "	
1915/16	30 " " Ammonsulfat	72 " " "	100 "	
1916/17	20 " " "	72 " " "	100 "	
1917/18	40 " " "	64 " " "	100 "	Ohne jede Düngung
1918/19	Ohne jede Düngung	Ohne jede Düngung	Ohne jede Düngung	
1919/20	60 kg als Ammonsulfat	100 kg als Superphosph.	100 kg	
1920/21	50 " " Natronsalp.	64 " " "	100 "	
1921/22	60 " " Ammonsulfat	106 " " Thomasmehl	100 "	In den vier verschiedenen Formen
1922/23	100 " " "	106 " " "	100 "	
1923/24	15 " " "	40 " " "	30 "	
1924/25	80 " " "	50 " " Superphosph.	100 "	
	40 " " "	50 " " "	50 "	

Tabelle XXIII.

Zusammensetzung einiger mit Kali gedüngten Böden und deren katalytische Kraft.

Düngungsart	Zusammensetzung in %							pH	Entw. ccm Sauerstoff
	FeO ₃ + AlO ₃	Mn ₃ O ₄	CaO	MgO	K ₂ O	P ₂ O ₅	N		
Ungedüngt	6,29	0,140	0,261	0,105	0,239	0,137	0,175	6,58	216,0
Grunddüngung . .	6,54	0,365	0,190	0,102	0,226	0,170	0,176	5,93	186,0
Kainit	6,36	0,335	0,176	0,153	0,254	0,174	0,177	5,67	190,5
40%ig. Kalisalz .	6,83	0,370	0,170	0,090	0,268	0,168	0,198	5,45	195,0
Chlorkali	6,48	0,593	0,181	0,110	0,252	0,179	0,187	5,52	184,0
K ₂ SO ₄	6,37	0,350	0,165	0,100	0,250	0,179	0,191	5,49	206,0

Bei den mit Kali gedüngten Böden sind somit geringe, meist innerhalb der Versuchsfehlergrenzen liegende Unterschiede zwischen den katalytischen Werten der einzelnen Düngungsarten festzustellen, so daß von einer wesentlichen Beeinflussung der katalytischen Kraft durch die Kalidüngung nicht gesprochen werden kann.

Da bei den Böden des Kalidüngungsversuchs auch eine Reihe physikalischer Eigenschaften mitbestimmt wurden, seien diese ebenfalls hier angeführt (Tabelle XXIV).

Tabelle XXIV.

Physikalische Eigenschaften der Böden eines Kalidüngungsversuchs.

Düngungsart	Litergewicht kg	Hygroskop. Wasser %	Wasser- kapazität %	Druck- festigkeit kg	Entwickelte ccm Sauerstoff
Ungedüngt	1,392	1,53	37,78	17,62	216,0
Grunddüngung . .	1,399	1,68	38,85	16,86	186,0
Kainit	1,406	1,65	37,57	18,67	190,5
40%iges Kalisalz .	1,403	1,68	38,48	16,80	195,0
Kaliumchlorid . .	1,388	1,71	39,05	16,33	184,0
Kaliumsulfat . . .	1,374	1,69	37,94	17,81	206,0

Ein Bild über den Zusammenhang zwischen katalytischer Kraft der Böden des geschilderten Kalidüngungsversuchs und Bakterienzahl bzw. der Anzahl der Pilze gibt Tabelle XXV.

Tabelle XXV.

 Zahl der Mikroorganismen¹ in einem Boden und katalytische Kraft.

Düngungsart	pH	Total keim- zahl	Bakterien									
			Gesamt- zahl	Nicht- ver- flüssiger	o/o	Ver- flüssiger	o/o	Aktino- myzeten	o/o	Sporen	o/o	
Ungedüngt . .	6,58	28 680	27 200	18 660	68,6	7 660	28,2	880	3,2	6900	25,4	
Grunddüngung	5,93	37 200	35 680	23 280	65,3	11 340	31,7	1060	3,0	8000	22,4	
Gr. + Kanit	5,67	36 900	35 800	24 740	69,2	9 900	27,6	1160	3,2	8460	23,6	
Gr. + 40%iges Kalisalz . .	5,45	30 150	29 400	17 000	57,8	12 000	40,8	400	1,4	8340	28,3	
Gr. + Chlorkali	5,52	16 160	15 960	96 600	60,5	5 700	35,7	600	3,8	4140	27,9	
Gr. + schwefels. Kalium . . .	5,49	34 740	34 140	23 280	68,2	9 660	28,3	1200	3,5	6940	20,3	

Düngungsart	pH	Total- keim- zahl	Pilze						Entw. ccm Sauerstoff			
			Gesamt- zahl	Schimmel- pilze	o/o	Hefen	o/o	Sporen	o/o	des luft- trockenen Bodens	des wasser- freien Bodens	des geglühten Bodens
Ungedüngt . .	6,58	28 680	1480	940	63,5	540	36,5	800	54,0	216,0	109,0	37,5
Grunddüngung	5,93	37 200	1600	1000	62,5	600	37,5	540	33,8	186,0	87,5	35,0
Gr. + Kanit	5,67	36 900	1100	800	73,0	300	27,0	66	6,0	19,5	96,5	31,0
Gr. + 40%iges Kalisalz . .	5,45	30 150	750	700	93,3	50	6,7	46	6,3	195,0	99,0	29,5
Gr. + Chlorkali	5,52	16 160	760	560	73,7	200	26,3	66	8,7	184,0	76,5	32,5
Gr. + schwefels. Kalium . . .	5,49	34 740	600	260	43,4	340	56,6	60	10,0	206,0	92,0	33,0

Der niedrigsten Totalkeimzahl entspricht zwar der niedrigste katalytische Wert; im übrigen ist aber keine Proportionalität zwischen Gesamtkeimzahl und Wasserstoffperoxyd spaltender Kraft zu beobachten; daß nach dem Trocknen und Glühen eine bedeutende Abnahme der katalytischen Kraft eintritt, beweist, daß die Mikroorganismen einen wichtigen Faktor dabei spielen. Die noch verbleibende katalytische Wirkung des geglühten Bodens kann aber nur durch anorganische Katalysatoren verursacht werden.

4. Die Hydroperoxyd spaltende Wirkung einiger künstlich hergestellter Produkte.

In Tabelle XXVI ist die katalytische Wirkung einiger künstlich hergestellter Produkte wiedergegeben, wobei reinste Originalpräparate von Merck oder Kahlbaum verwendet wurden.

¹ Vgl. auch K. J. Demeter, Über den Einfluß von Kaliumdüngemitteln auf die Mikroflora des Bodens (Fortschritte der Landwirtschaft 1927). K. Scharrer und A. Strobel, Versuche über die biochemische und kolloidchemische Wirkung des Kaliums (Zeitschr. f. angew. Chem. 89, 1481, 1926).

Tabelle XXVI.

Katalytische Wirkung einiger künstlicher Produkte.

Substanz	Angewandte Menge g	Entwickelte ccm Sauerstoff
Eisenhydroxyd	5	217,8
Ferrioxyd (nach <i>L. Brandt, Merck</i>)	5	261,3
Manganhydroxyd	0,5	286,5
Braunstein	0,5	261,0
Manganoxyduloxyd	0,5	232,0
Huminsäure	5	0
Kieselsäurehydrat	5	0
Kieselsäureanhydrid	5	0
Aluminiumhydroxyd	5	0

Die Manganoxyside zeigen mithin die weitaus größte katalytische Wirkung. Sonst erwiesen sich nur noch die Eisenoxyside Hydroperoxyd spaltend.

C. Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Zur Ermittlung der Hydroperoxyd zersetzenden Eigenschaft des Bodens — gewöhnlich katalytische Kraft oder katalytische Wirkung des Bodens oder auch, weniger exakt ausgedrückt, „Bodenkatalase“ genannt — hat sich methodisch die Messung des entwickelten Sauerstoffs auf gasvolumetrischem Wege als relativ genauestes und brauchbarstes Verfahren erwiesen. Dabei ist es aus Gründen der Beeinflussung der katalytischen Kraft des Bodens durch die veränderte Wasserstoffionenkonzentration notwendig, vollkommen säurefreies Wasserstoffperoxyd zu verwenden und nicht das Wasserstoffperoxyd für die Tropfen, dem zur Haltbarmachung stets geringe Mengen Säuren zugesetzt werden. Trotz der leichten Zersetzlichkeit dieses säurefreien Wasserstoffperoxyds werden bei genauer Einhaltung der mitgeteilten Arbeitsvorschriften gut übereinstimmende Resultate erzielt.

2. Obwohl die Werte für die katalytische Wirkung des Bodens keine direkte Funktion der p_H der Böden darstellen, wurde in dieser Arbeit wieder aufs Neue bestätigt, daß unzweifelhafte Zusammenhänge zwischen der Reaktion des Bodens und dessen Hydroperoxyd spaltendem Vermögen in der Hinsicht bestehen, daß im allgemeinen saure Böden diese Eigenschaft in viel geringerem Grade aufweisen als neutrale oder stark alkalische.

3. Der Gehalt der Böden an Eisen- und Manganverbindungen ist zwar ein sehr wichtiger, aber kein ausschlaggebender Faktor für die

Größe der katalytischen Wirksamkeit des Bodens. Je höher der Gehalt der Böden an Eisen- und Manganverbindungen ist, desto größer im allgemeinen das katalytische Vermögen.

4. Einem höheren Gehalt an Gesamtkalk entspricht im allgemeinen eine größere Wasserstoffperoxyd spaltende Kraft. Ein ähnlicher Zusammenhang zeigt sich zwischen dem in Chlorammon löslichen Calcium und der katalytischen Wirkung.

5. Sandige Böden weisen im allgemeinen die geringsten, Lehm- und Tonböden die höchsten katalytischen Werte auf. Humusböden ergeben meist höhere Zahlen als Mineralböden gleicher Zusammensetzung, Hochmoorböden infolge der sauren Reaktion jedoch niedrigere Werte als die meisten alkalischen Niedermoorböden.

6. Der Glühverlust eines Bodens hängt nur insofern mit dessen katalytischer Kraft zusammen, falls er einen Ausdruck für den Gehalt an Carbonaten und damit der alkalischen Reaktion der Böden darstellt.

7. Die Ergebnisse hinsichtlich des Zusammenhanges zwischen dem Tongehalt der Böden und der katalytischen Kraft bestätigen vollkommen die Befunde von *H. Kappen* und *P. Wachtel*, daß die wesentlichen katalytischen Bestandteile des Bodens seine Tonkolloide sind, daß aber diese katalytische Wirkung durch Basizität gefördert, durch Azidität gehemmt wird.

8. Zwischen der Hygroskopizität der Böden und deren Hydroperoxyd spaltenden Eigenschaft sind keine deutlichen Beziehungen zu beobachten.

9. Zerlegt man einen Boden in seine mechanischen Bestandteile und bestimmt deren katalytische Kraft, so zeigen die gröberen Fraktionen im allgemeinen einen geringeren katalytischen Wert als die feineren. Die Korngröße des Materials ist daher von Einfluß auf die katalytische Wirkung, und je größer die Dispersität, desto größer die Hydroperoxyd zersetzende Kraft.

10. Die katalytische Kraft des Bodens wird durch Behandeln mit anorganischen Salzen und organischen Stoffen verschieden beeinflusst, durch Behandeln mit Salzsäure, Aluminiumchlorid, Mercurichlorid und Kupfersulfat durchweg erniedrigt, durch Natriumhydroxyd und Ammoniak meist erhöht.

11. Kaliumcyanid wirkt nach den durchgeführten Untersuchungen meist erhöhend auf die Hydroperoxyd spaltende Eigenschaft der Böden, offenbar infolge der dadurch bewirkten Verschiebung der Reaktion ins alkalische Gebiet.

12. Durch Kochen und Erhitzen des lufttrockenen Bodens auf 100° bis zur Gewichtskonstanz wird seine katalytische Kraft etwas erniedrigt,

ebenso durch Sterilisieren. Durch Glühen erfolgt meist eine bedeutende Verringerung der Wasserstoffperoxyd spaltenden Eigenschaft. Eine Ausnahme bilden die an Eisenoxyd reichen Aschen der Moorböden.

13. Durch Bestrahlung mit ultravioletem Licht nimmt die katalytische Wirkung der Böden etwas ab.

14. Durch Düngung wird die katalytische Kraft des Bodens insofern beeinflusst, als bei dadurch bewirkter Verschiebung der Reaktion ins saure bzw. alkalische Gebiet die katalytische Wirksamkeit ab- bzw. zunimmt. Im übrigen konnten wenig Zusammenhänge bemerkt werden.

15. Zwischen der Totalkeimzahl und der Hydroperoxyd spaltenden Wirkung bestehen zwar keine direkten Zusammenhänge. Doch entsprach bei den untersuchten Böden der niedrigsten Totalkeimzahl der niedrigste katalytische Wert.

16. Von den untersuchten, als Bestandteile des Bodens eine wichtige Rolle spielenden Substanzen ergaben die Manganverbindungen die größte katalytische Kraft. Von den übrigen Stoffen zeigten nur noch die Eisenoxyde in erheblichem Maße eine Hydroperoxyd spaltende Wirkung.

17. *Die durchgeführten Versuche lassen neuerdings den Schluß zu, daß die katalytische Eigenschaft der Böden ein Komplex verschiedener Ursachen ist, daß sowohl anorganische Verbindungen, insbesondere Eisen- und Manganoxyde, als auch organische Stoffe und biochemische Faktoren eine Rolle dabei spielen. Jedoch sind bei der großen Menge anorganischer Katalysatoren, die die meisten Böden aufweisen, diese entschieden die wichtigsten Träger der katalytischen Wirkung, im Vergleich zu denen die organischen und mikrobiologischen Faktoren wohl stark in den Hintergrund treten.*

18. Die Ermittlung der Hydroperoxyd spaltenden Kraft der Böden ist mithin zwar für bodenkundliche Studien nicht ohne Bedeutung. Jedoch muß im Hinblick auf die geschilderte komplexe Natur dieser Bodeneigenschaft es abgelehnt werden, *aus ihr allein* etwaige tiefere Schlüsse auf physikalische Eigenschaften, über Nährstoffverhältnisse bzw. biochemische Bodenprozesse und damit auf die Bodenfruchtbarkeit ziehen zu wollen, und nach wie vor wird die Fähigkeit des Bodens, Wasserstoffperoxyd zu zersetzen, mehr theoretisches als praktisches Interesse für sich beanspruchen.

D. Literatur.

1) Bezüglich der umfangreichen Literatur über dieses Gebiet und die bisherigen Arbeiten vgl. auch K. Scharrer, Landw. Versuchsstationen 1927 (im Druck). — 2) Vgl. hierzu Wohlgemuth, Grundriß der Fermentmethoden,

- S. 284. Berlin, J. Springer, 1913; *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen 1925, S. 355. — 3) *H. Kappen*, Die katalytische Kraft des Ackerbodens, Probevorlesung, gehalten am 24. Februar 1913 an der Universität Jena. Fühlings landwirtsch. Zeit. **62**, 377, 1913; *P. Wachtel*, Die Wasserstoffsuperoxydkatalase durch Boden. Dissertation Jena 1912. — 4) *J. König*, Die Untersuchung landwirtsch. u. landwirtsch.-gewerblicher Stoffe. Berlin 1923. — 5) *D. Meyer*, Die Kalk- und Magnesiadüngung. Berlin 1910. — 6) *Kopecky*, Die Bodenuntersuchung zum Zwecke der Drainagearbeiten mit besonderer Berücksichtigung der Ausführung mechanischer Bodenanalysen mittels eines neu kombinierten Schlammapparates. Prag 1901. — 7) *A. Mitscherlich*, Bodenkunde für Landwirte. — 8) *J. König*, *E. Koppenrath* und *J. Hasenbäumer*, Landw. Versuchsst. **66**, 401, 1907. — 9) *L. Smolik*, Mitteil. d. Intern. Bodenkundl. Gesellsch. **1**, 6, 1925 (neue Folge)

Insulin und Fructosediphosphorsäure.

Von

E. Forrai.

(Mitteilung aus der III. internen Klinik der k. u. Pázmány-Péter-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 28. Juli 1927.)

Die Entdeckung des Insulins hat den intermediären Kohlenhydratstoffwechsel wieder in den Mittelpunkt der Untersuchungen gestellt. Die Annahme, daß das Insulin die Kohlenhydratverbrennung steigert, führt natürlicherweise zu der Frage, ob sich der Angriffspunkt des Insulins auf eine definierte Phase des Kohlenhydratabbaues lokalisieren läßt.

Die Kohlenhydratstoffwechselforschung im pflanzlichen und tierischen Organismus führte durch die Arbeiten von *Neuberg*, *Embsen*, *Harden* und *Young* usw. zur Isolierung mannigfacher Zwischenprodukte. Bei dem wechselvollen Spiele des Auf- und Abbaues kommen zahlreiche Enzyme zu bedeutender Rolle. Es war daher naheliegend, im Insulin einen Aktivator der Enzyme zu suchen.

Es wurden zahlreiche Versuche angestellt, um die Wirkung des Insulins auf die einzelnen Phasen des Zuckerstoffwechsels nachzuweisen. Die Komplexität der Insulinwirkung bot genügende Gelegenheit zum Studium der einzelnen Phasen. Im nachstehenden soll auf die Beeinflussung der enzymatischen Spaltung der Fructosediphosphorsäure durch Insulin *in vitro*, sowie die Wirkung der Hexosediphosphorsäure auf das insulinisierte Kaninchen besprochen werden.

I.

In der Annahme, daß das Insulin in den oxydativen Zuckerabbau eingreift, wurde vor allem die Wirkung des Insulins auf die Hefegärung studiert. *Laufberger* (1) konnte jedoch bei der Messung der Kohlensäure eine Änderung nicht feststellen.

Die ersten, die *in vitro* das direkte Eingreifen des Insulins in den intermediären Kohlenhydratstoffwechsel zeigen konnten, waren *Neuberg*, *Gottschalk* und *Strauß* (2). Dem Gewebebrei zugesetztes Insulin steigerte

die Menge des Oxydationsproduktes — des Acetaldehyds —, während das Adrenalin die Entstehung dieser Zwischenstufe hemmt. Dies war der erste direkte Beweis für den fördernden *Einfluß des Insulins* auf den oxydativen Kohlenhydratabbau in Leber und Muskelzelle.

Die Untersuchungen von *Winter* und *Smith* bezüglich der verschiedenen Formen von Glucose gaben die Veranlassung zur Annahme von einer reaktionsfähigen und labilen Form des Blutzuckers. Nach *Neuberg*, *Gottschalk* und *Strauß* ist die Annahme gerechtfertigt, daß das Insulin in der zuckerverarbeitenden Tierzelle die Bildung dieser labilen Glucosemodifikation, *die den eigentlichen Kohlenhydratumsatz einleitet und engste Beziehungen zur Phosphorsäure unterhält*, reguliert; und zwar scheint die Veresterung des Zuckers mit der Phosphorsäure den Zucker in diese reaktionsfähige Form — welche dem Abbau eher zugänglich ist — umzuwandeln¹.

Dem Lactacidogen — das heißt also der Hexosediphosphorsäure — wurde bei der Insulinwirkung — in vivo — eine größere Aufmerksamkeit geschenkt, da es nicht auszuschließen war, daß der verschwundene Zucker in dieser Form wiederzufinden wäre. Es sprach vieles dafür. *Harrop* und *Benedict* (4) fanden als erste, daß die anorganische Phosphorsäure des Blutes parallel mit der Blutzuckersenkung auf Insulineinfluß vermindert wird. Dieser Befund konnte von *Staub*, *Günther* und *Fröhlich*, sowie *Perlzeig* (4) bei Menschen und bei Tieren bestätigt werden. *Wigglesworth* (4) hat den Verlauf des anorganischen Phosphorgehalts im Blute genau verfolgt und fand, daß der Phosphorgehalt nach einer Einspritzung von etwas mehr als einer Krampfdosis schnell um etwa 30% absank. *Kay* und *Robison* (4) fanden eine Vermehrung organischer Phosphorsäure im Blute auf Insulin.

Es muß allerdings bemerkt werden, daß *Perlzeig* und *Wigglesworth* die Menge der organischen Phosphate nach Insulin nahezu unverändert fanden, was gegen eine eventuelle Bildung lactacidogenähnlicher Stoffe im Blute spricht.

Die Untersuchungen von *Brugsch* und *Horsters* (5) zeigten in die Richtung, daß das Insulin eventuell als Aktivator der Phosphatase, also des die Esterifizierung katalysierenden Enzyms anzusehen wäre. *Brugsch* gelang es, in einer anorganischen Phosphatlösung, welcher Zucker beigegeben wurde, durch Muskelbrei und Leber eine Verminderung des anorganischen Phosphats zu beobachten mit einer gleichzeitigen Abnahme der Rechtsdrehung der Lösung nach Insulinzugabe. Allem Anschein nach handelte es sich um die Bildung eines Zuckerphosphorsäureesters, welcher Vorgang durch Insulin aktiviert wird. Die Versuche von *Brugsch*, sowie die Befunde *Benedicts* und zahlreiche anderer sprachen für eine Esterifizierung der Hexose zur Phosphorsäure auf Insulinwirkung.

Da die Rolle der Hexosediphosphorsäure als intermediäre Form des Kohlehydratabbaues in tierischen und pflanzlichen Zellen geklärt wurde, sprach vieles dafür, daß die Hauptwirkung des Insulins auf die diesen Ester auf- und abbauenden Enzyme lokalisiert ist.

¹ *Pringsheim*, diese Zeitschr. 156, 109, 1925.

Es war daher eine wichtige Frage, ob das Insulin die enzymatische Spaltung der Fructosediphosphorsäure, zu dessen Synthese es verhilft, unbeeinflusst läßt oder nicht.

Demuth (6) untersuchte die Insulinwirkung im Blute auf die Hexosediphosphatase, und seine Befunde fielen negativ aus, was im nachstehenden bestätigt wird. Außerdem wurde die Untersuchung auf die Leber und Muskulatur ausgedehnt. Es konnte jedoch eine Änderung der Fructose-diphosphatasewirkung durch Insulin nicht erreicht werden.

Die nachstehenden Untersuchungen beziehen sich auf einige Organfructosediphosphatasen, auf deren Wirkung der Zusatz von Insulin studiert wurde.

Die Organe wurden zum Teil in getrockneter Form von Organbrei in einer Lösung von hexosediphosphorsaurem Natrium (gewonnen mit Na-oxalat aus *Bayerschem* Candiolin) suspendiert, die Lösungen wurden auf die für die Spaltungsfähigkeit der Organe optimale Wasserstoffionenkonzentration gepuffert, wie sie von *Demuth* festgestellt wurden, mit Toluol versetzt und in Thermostaten gestellt. Nach 24 Stunden wurde in einem aliquoten Teil der anorganische Phosphor bestimmt nach *Bell* und *Doisy*. Es seien hiernach einige Versuche mitgeteilt, in denen bei gar keiner Organphosphatase eine Differenz nachgewiesen werden konnte.

Versuche.

Versuch 3.

1. 50 ccm $\frac{1}{2}$ %iges fructosediphosphorsaures Natrium + 3,75 ccm n/10 HCl + 10 g Muskelbrei + Toluol.
2. 50 ccm $\frac{1}{2}$ %iges fructosediphosphorsaures Natrium + 3,75 ccm n/10 HCl + 10 g Muskelbrei + 0,5 ccm Insulin *Wellcome* + Toluol.
4. 50 g destilliertes Wasser + 3,75 ccm n/10 HCl + 10 g Muskelbrei + Toluol.

Die Lösungen wurden auf p_H 7,4 gepuffert.

Versuch 12.

1. 2,5 ccm Blut + 50 ccm $\frac{1}{2}$ %iges fructosediphosphorsaures Natrium + Toluol.
5. 2,5 ccm Blut + 50 ccm $\frac{1}{2}$ %iges fructosediphosphorsaures Natrium + 0,5 ccm Insulin *Wellcome* + Toluol.

Versuch 13.

1. 0,5 g Leberpulver + 50 ccm $\frac{1}{2}$ %iges hexosediphosphorsaures Natrium + 7,5 ccm n/10 HCl + Toluol.
7. 0,5 g Leberpulver + 50 ccm $\frac{1}{2}$ %iges hexosediphosphorsaures Natrium + 7,5 ccm n/10 HCl + 0,5 ccm Insulin *Wellcome* + Toluol.

Die Hexosediphosphorsäurelösung wurde auf $p_H = 5,5$ gepuffert.

Die anorganischen Phosphorwerte sind auf P_2O_5 umgerechnet.

Versuch Nr.	Kolben Nr.	P in mg			Zersetzte Fructosediphos- phorsäure in %
		0 Zeit	24 Std.	Differenz	
3	1	0,134	0,194	0,060	16,57
3	2	0,129	0,182	0,053	15,98
3	4	0,121	0,117	—	—
12	1	0,039	0,119	0,080	22,10
12	5	0,045	0,131	0,086	23,81
13	1	0,011	0,112	0,101	27,96
13	7	0,011	0,118	0,107	29,56

Es ist allerdings merkwürdig, daß das Insulin, welches im Kohlenhydratstoffwechsel eine so bedeutende Rolle spielt und wie es die neueren *Untersuchungen* (7) zeigen, in sämtlichen Organen nachweisbar ist, auf ein so wichtiges Ferment des Kohlenhydratabbaues, wie die Fructosediphosphatase, dessen ubiquitäres Dasein ebenfalls nachgewiesen werden konnte (8), gar keinen Einfluß ausübt. Es ist jedoch aus den Versuchen eindeutig ersichtlich, daß das Insulin die Hexosediphosphorsäurespaltung in vitro nicht beeinflusst.

II.

Es wurde versucht, den durch Insulin hervorgerufenen hypoglykämischen Komplex, der durch Glucose sofort verschwindet, ebenfalls durch Fructosediphosphorsäure bzw. fructosediphosphorsaure Natriumlösung zu beeinflussen.

Die Versuche von *Noble* und *Macleod* (4) zeigten, daß die Lävulose fast ebenso wirkt, wie die Glucose. Fast dieselbe Wirkung hat Mannose, Galaktose wirkt schwächer. Die Versuche von *Abelin* und *Goldner* (9) zeigten die Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels durch Phosphate. Per os verabreichtes Dinatriumhydrophosphat konnte beim Tiere je nach der angewandten Menge des nachher eingespritzten Insulins die Hypoglykämie entweder vollständig unterdrücken oder sehr wesentlich herabsetzen.

Da der tierische Organismus die Fructosediphosphorsäure zu zerlegen imstande ist, da die Hypoglykämie mit Lävulose und Phosphat zu beeinflussen war, konnte daran gedacht werden, ob Fructosediphosphat auch in diesem Sinne wirkt.

Ein Kaninchen erhielt 15 Einheiten Insulin. Nach 3 ½ Stunden kam es zu Krämpfen. Sofort wurden 20 cem einer 20 %igen Lösung von fructosediphosphorsaurem Natrium intravenös gegeben. Die Krämpfe wiederholten sich mit derselben Heftigkeit und konnten durch Glucose momentan gelöst werden.

Wurden 10 cem einer 20 %igen Lösung einem Kaninchen (2 kg) nüchtern gegeben, so verhielt sich der Blutzucker wie folgt:

Nüchtern	0,112, 0,118 %
2 Stunden nach der Injektion . .	0,129, 0,136, 0,136 %

Ein drittes Kaninchen erhielt 10 ccm 20%iger Lösung intravenös und 25 Minuten nachher 10 Einheiten Insulin *Wellcome*. Der Blutzucker verhielt sich folgendermaßen:

Nüchtern 0,097, 0,090 %
 10 Uhr: 10 ccm 20%igen fructosediphosphorsauren Natriumsintravenös.
 10 Uhr 35 Minuten: 0,5 ccm Insulin *Wellcome*,
 12 Uhr 35 Minuten: Blutzucker: 0,028, 0,027, 0,025 %.

Nachher in einigen Minuten Krämpfe, die auf Dextrose gelöst werden.

Es geht aus den Versuchen hervor, daß die Hexosediphosphorsäure, obzwar sie eine intermediäre Form im Kohlenhydratabbau und ein von solchen Bestandteilen zusammengesetzter Ester ist, welcher allein die Insulin-hypoglykämie stark beeinflusst, und obzwar vom tierischen Organismus zerlegbar, den hypoglykämischen Zustand — die Krämpfe — unbeeinflusst läßt.

Literatur.

- 1) *Laufberger*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 1, S. 264. — 2) *Neuberg, Gottschalk und Strauß*, Deutsch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 45. — 3) *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. 155, 348, 1925. — 4) Zit. nach *Grevenstuck und Laqueur*, Insulin, Asher-Spiro 23. — 5) *Brugsch und Horsters*, zusammenfassend in der Med. Klin. 1926, Nr. 3. — 6) *F. Demuth*, diese Zeitschr. 166, 162, 1926. — 7) *Nothmann*, Klin. Wochenschr. 1926, Nr. 8. — 8) *Forrai*, diese Zeitschr. 145, 475, 1923. — 9) *Abelin und Goldener*, Klin. Wochenschr. 4, Nr. 51.

Untersuchungen über menschliche Fructosediphosphatase. II.

Von
Elemér Forrai.

(Mitteilung aus der III. internen Klinik der k. u. Pázmány-Péter-Universität
in Budapest.)

(Eingegangen am 28. Juli 1927.)

Die menschliche Fructosediphosphatase war im Blute zwar nachweisbar, jedoch nur im Blutkuchen, das Serum zeigte fast gar keine Spaltung. Bei Säuglingen jedoch konnte *Demuth* (1) eine Änderung dieses Umstandes wahrnehmen. Seine diesbezüglichen Untersuchungen gehören nicht hierher, zeigten jedoch, daß im Serum Phosphatasen nachweisbar waren. Es konnte daher daran gedacht werden, daß dieses Enzym von den Organen extrahierbar wäre, wie es in den nachstehenden Versuchen tatsächlich nachweisbar gewesen ist.

Die wässrige Extraktion bildet seit langer Zeit her — seit den Arbeiten *Willstätters* — eine der bekanntesten Versuche der Enzymreinigungen, welche zum weiteren Studium die Fermente von den unwesentlichen Begleitstoffen befreien. Die Organe, welche ich bei meinen Versuchen benutzte, waren menschliche Muskeln, Leber und Niere. Die Organe wurden fein zerhackt, bis zu einer fein breiigen Konsistenz, nachher mit einer physiologischen Kochsalzlösung übergossen in der Proportion 1 : 3, und in einer Schüttelmaschine eine Stunde lang geschüttelt. Es wurde von jedem derart verarbeiteten Organe nun je eine Flasche in den Thermostaten bei 37° C unter Toluol, eine andere im Eisschrank 24 Stunden stehengelassen und nachher abfiltriert; die so gewonnenen Extrakte waren wasserklar und, mit Toluol versetzt, einige Tage haltbar.

Es handelte sich nun zuerst um den Nachweis, ob die Fructosediphosphatase überhaupt wässrig extrahierbar ist.

Tomita (2) hat gezeigt, daß die Saccharosephosphatase von Leber und Niere in zellfreien Extrakten nachweisbar war.

In meinen Versuchen wurden von wässrigem Extrakt einige Kubikzentimeter einer 1%igen fructosediphosphorsäuren Na-Lösung — gewonnen mit Ca-oxalat aus dem Bayerischen Candiolin — zugesetzt,

in den Thermostaten gestellt und die abgespaltene anorganische Phosphorsäure zum Teil gravimetrisch, zum Teil kolorimetrisch nach *Bell* und *Doisy* bestimmt. Die Resultate sind in der Tabelle I zusammengestellt. Die auf Eis und in Thermostaten gestellten Extrakte zeigten keine Differenz. Wie aus der Tabelle ersichtlich, zeigen alle untersuchten Organextrakte eine deutliche Spaltung der Fructosediphosphorsäure; daß der Vorgang enzymatisch ist, wurde durch Aufkochen des Extraktes nachgewiesen, hiervon ist ein Beispiel in der Tabelle bei der Niere wiedergegeben.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Untersuchter Organextrakt	Gefundenes $Mg_2P_2O_7$ bzw. anorg. P	$Mg_2P_2O_7$ bzw. P_2O_5 von 0 auf 24 Std. umger. auf 100 cm ³	Zersetzte Fructosediphosphorsäure $\frac{0}{10}$
1	Leber	0,0202	0,0390	15,06
	Leber aufgekocht	0,0124	—	—
5	Muskel	—	—	—
	0 Std.	—	—	—
	24 "	0,0031	0,071	21,4
15	Niere	—	—	—
	0 Std.	0,017	0,0349	10,5
	48 "	0,032	—	—
15	Niere aufgekocht	—	—	—
	0 Std.	0,0017	—	—
	48 "	0,0017	—	—

Die weitere Frage war, wie sich die Extrakte zum Insulin verhalten.

Die *Meyerhofschen* (3) Untersuchungen zeigten, daß das Coferment der Hefegärung in allen tierischen Organen nachweisbar ist. Dieselben Untersuchungen zeigten, daß die Atmung der Muskulatur durch Auswaschen mit Wasser erlischt und durch Zugabe des Muskelkochsaftes bzw. Hefekochsaftes wieder hervorgerufen wird. Die Untersuchungen von *Brugsch* und *Horsters* (4), sowie von *Virtanen* (5) sprechen dafür, daß das Insulin ein Aktivator der Zuckerphosphorsäuresynthese sei. *Virtanen* spricht die Vermutung aus, daß auf Insulinwirkung die Zunahme des Hexosediphosphats vielleicht deshalb im Blute nicht nachweisbar ist, weil die Spaltung in demselben Maße wie die Synthese beschleunigt wird. *Ich konnte* (6) in einer früheren Mitteilung zeigen, daß das Insulin auf die Organphosphatasen gar keine Wirkung ausübt. Das konnte in derselben Weise auch für das Blut nachgewiesen werden. Die enzymologische Frage ist außerdem, ob die Synthese und Spaltung der Fructosediphosphorsäure durch die Wirkung desselben Enzyms zustande kommt oder nicht. Die Frage ist trotz der Untersuchungen von *Euler* (7), die für die Verschiedenheit, und *Embdens* (7), die für die Einheit beider Fermente sprechen, nach *Oppenheims* (7) Meinung nicht entschieden.

In den im nachstehenden zu veröffentlichen Versuchen wurde zuerst die Frage gestellt, ob Insulin die Wirkung der Extrakte einflußt oder nicht. Das Insulin zeigte keine Wirkung. In einem anderen

Versuche wurde der Extrakt aufgeköcht und so unwirksam gefunden, nun konnte geprüft werden, ob das Insulin den aufgeköchten Extrakt aktiviert. Der Versuch fiel auch negativ aus.

Versuch 15.

Kolben Nr. 1. 2 ccm Nierenextrakt + 20 ccm 1 %ige fructosediphosphorsaure Natriumlösung + Toluol.

Kolben Nr. 2. 2 ccm Nierenextrakt + 20 ccm 1 %ige fructosediphosphorsaure Natriumlösung + Kochen + Toluol.

Kolben Nr. 3. 2 ccm Nierenextrakt + 20 ccm 1 %ige fructosediphosphorsaure Natriumlösung + 0,5 ccm Insulin *Wellcome* + Toluol.

Kolben Nr. 4. 2 ccm Nierenextrakt + 20 ccm 1 %ige fructosediphosphorsaure Natriumlösung + Kochen + 0,5 ccm Insulin *Wellcome* + Toluol.

Kolben Nr. 6. 2 ccm Nierenextrakt + 20 ccm destilliertes Wasser + Toluol.

Tabelle II.

Kolben Nr.	Zeit Std.	Gefundenes anorganisches P	Differenz von 0 auf 48 Std. umgerechnet auf P_2O_5 in 100 ccm	Zersetzte Fructosediphosphorsäure %
1	0	0,0170	0,0349	10,5
	24	0,0258		
	48	0,0320		
2	0	0,0170	—	—
	24	0,0166		
	48	0,0170		
3	0	0,0156	0,0357	10,75
	24	0,0234		
	48	0,0312		
4	0	0,0162	—	—
	24	0,0170		
	48	0,0160		
6	0	0,0066	—	—
	24	0,0062		
	48	0,0061		

Aus den Versuchen ergibt sich, daß das Insulin auf die Phosphatase keine Wirkung im Extrakt ausübt, der aufgeköchte Extrakt wird nicht aktiviert. Insulin und Cozymase sind voneinander verschieden. Daher ist das Insulin kein Aktivator der Phosphatase und, wenn die Phosphatase durch Insulin beeinflußt wird, wie es *Virtanen* und *Brugsch* annehmen, von diesem Enzym verschieden.

Zusammenfassung.

Die menschliche Fructosediphosphatase ist ein aus den Organen (Leber, Muskel, Niere) extrahierbares Enzym. Die Fructosediphosphorsäurespaltung durch Organextrakte wird durch Insulin unbeeinflusst gelassen, durch Kochen inaktivierte Extrakte werden nicht aktiviert.

Literatur.

1) *F. Demuth*, diese Zeitschr. 159, 415, 1925. — 2) *M. Tomita*, ebendasselbst 181, 170, 1922. — 3) *C. Meyerhof*, H. 101, 102. — 4) *Th. Brugsch* und *H. Horsters*, zusammenfassend in Med. Klin. 1926, Nr. 3. — 5) *A. Virtanen*, diese Zeitschr. 171, 76, 1926. — 6) *E. Forrai*, diese Zeitschr. 189, 150, 1927. — 7) *Oppenheimer*, Die Fermente. 1925.

Der normale Bilirubinspiegel in menschlichen Seren.

Von
Rudolf Sivó.

Aus der III. medizinischen Klinik der k. ungar. Pázmány-Péter-Universität
in Budapest.)

(Eingegangen am 28. Juli 1927.)

Vor anderthalb Jahren haben wir die in Gemeinschaft mit Dr. *Enriques* (3) ausgearbeitete Methode zur Bestimmung des Bilirubins mitgeteilt. Es gelang uns mit Hilfe dieses Verfahrens, sogar das indirekte Bilirubin ohne Fällung der Eiweißkörper zu bestimmen. Die Fehlerquellen, die durch Eiweißfällung entstehen, hatten wir bereits eingehend erörtert. Unsere neue Methode, welche mittels Koffein das indirekte Bilirubin von seiner Eiweißbindung löst, ermöglicht das Bilirubin ohne durch die Eiweißfällung verursachten Verlust exakt zu bestimmen. Es wurde daher die Bestimmung des normalen Serumbilirubinwertes zur Aufgabe gestellt, da die Meinungen in dieser Frage noch immer ziemlich abweichend sind.

Hijmans van den Bergh (7), der als erster sich mit der Frage des normalen Blutbilirubinspiegels beschäftigte, fand 0,10 bis 0,30 mg-% Bilirubin in Seren solcher Individuen, wo eine Erkrankung der Leber und der Gallenwege auszuschließen war. Die Nachforschungen der letzten Jahre ergaben aber einstimmig, daß diese Werte viel zu niedrig bemessen waren [*Cserna* (2)] und setzten die obere Grenze des normalen Bilirubinwertes viel höher; so bezeichnet *Haselhorst* (5) als höchsten Normalwert 0,50 mg-%, *Mandelbaum* (9) 0,62 mg-%, *Botzian* (1) 0,75 mg-% und *Förster* (4) 1 mg-%. *Hetényi* (6) gibt als höchsten Normalwert 2 mg-% an. Wir selbst gaben seinerzeit keine endgültigen Zahlen als Normalwerte des Serumbilirubins an, da die Zahl unserer sogenannten Normalseren zu klein war, außerdem bei einem Teile derselben eine pathologische Erhöhung des Bilirubinspiegels nicht auszuschließen war.

Um die physiologischen Werte festzustellen, hatten wir seitdem 200 Sera teils von Gesunden, teils von solchen Patienten aufgearbeitet,

wo Anämie, Infektionskrankheiten, sowie allerlei organische Leiden auszuschließen waren. In folgender Tabelle sind die erhaltenen Werte der untersuchten Fälle wiedergegeben.

Bilirubinwert	0,65 bis 0,70	0,70 bis 0,75	0,75 bis 0,80	0,80 bis 0,85	0,85 bis 0,90	0,90 bis 0,95	0,95 bis 1,00	1,00 bis 1,05	1,05 bis 1,10	1,10 bis 1,15	1,15 bis 1,20	Zu- sammen
Gesamtzahl der Fälle	2	8	9	31	34	37	27	19	16	11	6	200
%-Zahl der Fälle	1	4	4½	15½	17	18½	13½	9½	8	5½	3	100

Wie aus der Tabelle ersichtlich, fallen 82% aller Fälle zwischen 0,80 mg-% und 1,10 mg-%. 9½% der Normalfälle ergibt ein Wert zwischen 0,65 und 0,80 mg-%. Niedrigere Werte, wie 0,65 mg-%, wurden auch bei den sehr zahlreichen pathologischen Fällen nie erhalten, trotzdem das Verfahren nur mit einer zweifachen Verdünnung arbeitet, also die Bestimmung von Seren niedrigen Bilirubingehaltes nicht erschwert. Die Annahme, daß gewisse Krankheiten zu einer Verminderung des physiologischen Blubilirubinspiegels, also zu einer pathologischen Hypobilirubinämie, führen können, wurde nicht bestätigt.

8½% Sera vollkommen Gesunder ergab Werte von 1,10 bis 1,20 mg-%, so darf nur ein Bilirubinspiegel über 1,20 mg-% als Hyperbilirubinämie gedeutet werden, wobei aber die Möglichkeit nicht aufgeschlossen ist, daß manchmal vielleicht schon Werte unter 1,20 mg-% als individuell erhöhte zu betrachten sind. Es seien zwei Beispiele aufgeführt.

1. In einem Falle von toxischer Bronchopneumonie wurde am fünften Tage der Erkrankung ein Serumbilirubinwert von 1,16 mg-% erhalten. Ein Wert von 0,86 mg-%, erhalten eine Woche nach Genesung, bewies, daß der Wert von 1,16 mg-% während der Krankheit schon als individuell erhöht zu betrachten war.

2. Ebenso sank der Serumbilirubinspiegel von 1,09 mg-% bei einer akuten Appendicitis 10 Tage nach der geglückten Operation auf 0,83 mg-%.

Die Diagnose solcher individuell erhöhten Bilirubinwerte, welche unter dem oben angegebenen höchsten Normalwert liegen, kann oft durch eine Pleiochromie des Duodenalsaftes ermöglicht werden.

Zusammenfassung.

1. Die große Mehrzahl der Normalfälle ergibt Serumbilirubinwerte von 0,80 bis 1,10 mg-%.

2. Werte über 1,20 mg-% sind bestimmt als pathologische zu betrachten.

3. Die Möglichkeit einer pathologischen Hypobilirubinämie konnte nicht bestätigt werden.

4. Es gibt Serumbilirubinwerte in der Nähe, aber unterhalb des oberen Normalgrenzwertes, die schon individuell erhöht sein können.

Literatur.

- 1) *Botzian*, Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chirurg. **82**, 1920. — 2) *Cserna*, Orvosképzés 1924. — 3) *Enriques* und *Sivó*, diese Zeitschr. **169**, 152, 1926. — 4) *Förster*, Klin. Wochenschr. **1925**. — 5) *Haselhorst*, Münch. med. Wochenschr. 1921. — 6) *Hetényi*, Zeitschr. f. klin. Med. **95**, 1922. — 7) *H. v. d. Bergh*, Der Gallenfarbstoff im Blute. Leipzig 1918. — 8) *H. v. d. Bergh* und *Schnapper*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **110**, 1913. — 9) *Mandelbaum*, Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäk. **59**, 1922.
-

Physikalisch-chemische Eigenschaften des Bilirubins in Körperflüssigkeiten.

Von

E. Forrai und R. Sivó.

(Mitteilung aus der III. medizinischen Klinik der k. u. Pázmány-Péter-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 28. Juli 1927.)

I.

Seit den grundlegenden Untersuchungen *Hijmans van den Berghs*, die die Aufmerksamkeit auf die besondere klinische Bedeutung der Bilirubinfrage lenkten, wurde in zahlreichen Arbeiten, hauptsächlich im praktischen Zusammenhange, die Frage erörtert.

Bekanntlich erhöht sich bei verschiedenen Krankheiten der Bilirubinspiegel des Blutes und es entsteht eine Hyperbilirubinämie. Auf Grund der Diazoreaktion wurden zwei Reaktionstypen des Bilirubins unterschieden, direkte Reaktion mit unmittelbarer Diazokuppelung und indirekte Reaktion mit einer nur nach Alkoholzusatz erfolgenden Verfärbung. Man glaubte aus dem verschiedenen Verhalten der bilirubinämischen Sera gegenüber der Diazoreaktion wichtige Schlüsse auf die Pathogenese der verschiedenen Ikterusformen machen zu können, indem bei der größten Mehrzahl der mechanischen Ikterusfälle sich eine direkte, dagegen bei den dynamischen Ikterusfällen eine indirekte Reaktion ergibt.

Es wurde zuerst von hepatischem und anhepatischem Bilirubin gesprochen. *Hijmans van den Bergh* sprach die Vermutung aus, daß die Galle direkt reagierte, daß in den direkt reagierenden Sera gewisse Stoffe enthalten sein dürften, die sich auch in der Galle fänden. Andere Autoren [*Feigl* und *Quarner*, *Rosenthal* und *Holzer*(1)] dachten bei indirekt reagierenden Seren an eine „Maskierung“ des Bilirubins durch Bindung an Lipide oder Eiweiß.

Tannhäuser (2) vermutete eine wechselnde Teilchengröße des direkten und indirekten Bilirubins, dachte also in dem verschiedenen Lösungszustande des Bilirubins im Serum die Ursache der indirekten Reaktion zu erblicken. *Leschke* (3) äußerte sich in einer Aussprache der Berliner medizinischen Gesellschaft bezüglich hepatischer und anhepatischer Bildung des Bilirubins dahin, daß der Unterschied des direkten und indirekten Bilirubins ein kolloid-physikalischer ist, zu dessen Nachweis ihm Ultrafiltrationsversuche dienten. Es gelang ihm, nach einer eigenen, näher nicht mitgeteilten Methode Ultrafilter von einer relativ hohen Durchlässigkeit

herzustellen, welche aus dem Serum das direkt reagierende Bilirubin zum Teil durchließen, das indirekt reagierende dagegen nicht. Die kürzlich erschienenen und breit angelegten Untersuchungen von *Adler* und *Strauß* (4) bestätigten die Meinung *Hijmans van den Berghs*, daß es sich sowohl bei mechanischem, wie auch bei dynamischem Ikterus um dasselbe Gallenpigment handelt, und zeigten sogar, daß direkte und indirekte Reaktionen im Serum in der Hauptsache nur durch ihr kolloidales Reaktionsmilieu geschieden sind. Das kolloidale Milieu führt je nach der Quantität seiner Bestandteile (Verschiedenartigkeit der Dispersität) bald zur direkten, bald zur indirekten Reaktion. Nach *Piotrowsky* (5) wäre die Bedingung einer direkten Reaktion das freie, an Eiweiß nicht gebundene Bilirubin.

Auf Grund dieser Anschauungen war der Gedanke naheliegend, daß *das direkte Bilirubin im Serum in kristalloider Form, während das indirekte an die Kolloide gebunden vorhanden ist, folglich voneinander durch Ultrafiltration trennbar wären.*

Um den physikalisch-chemischen Zustand des in den physiologischen Flüssigkeiten enthaltenen Bilirubins zu klären, wurden mit verschiedenen bilirubinhaltigen Körperflüssigkeiten bzw. künstlichen Bilirubinlösungen Ultrafiltrationsversuche vorgenommen. Die Ultrafiltrationen wurden durchweg mit dem *Bechholdschen* Ultrafilter-Apparat unter Oxygendruck von 4 bis 8 Atmosphären ausgeführt.

Um die Durchlässigkeit der Filter für Bilirubin zu prüfen, wurde eine künstliche Bilirubinlösung durch die Filter mit der kleinsten Porengröße filtriert ($7\frac{1}{2}\%$ nach *Schleicher & Schüll*), die sich für Bilirubin durchlässig zeigten, wenn auch das Filtrat wegen der Durchtränkung des Filters und eventueller rascherer Oxydierbarkeit unter höherem Druck nicht vollständig quantitativ die ursprüngliche Bilirubinkonzentration aufwies. So erhielten wir zum Beispiel: bei der Filtration einer künstlichen Bilirubinlösung von 8,67 mg.-% durch ein Filter von 4,5, welche wir im weiteren allgemein benutzten, ein Ultrafiltrat von 7,81 mg.-%. Eine Einkonzentrierung des Filtrationsrückstandes in bezug auf Bilirubin konnte nicht beobachtet werden.

Somit war die kristalloide Natur einer künstlich hergestellten Bilirubinlösung bewiesen.

Es wurde stets mit einem von der Firma Theodor Schuchardt in Verkehr gebrachten Bilirubin gearbeitet, welches in etwa n/100 NaOH gelöst und nachher mit destilliertem Wasser weiter verdünnt wurde. Wegen der Zersetzlichkeit wurden die Lösungen stets in der Dunkelkammer frisch hergestellt.

Sodann konnte zu der Filtration von Seren übergegangen werden. Wir arbeiteten durchweg mit 4,5%igen Eisessigkollodiumfiltern der Firma *Schleicher & Schüll*, die alle für Eiweiß undurchlässig waren (geprüft mit Sulfosalicylsäure). Die Auswahl dieser Filter schien uns deshalb am zweckmäßigsten, weil diese sich bereits an der Grenze der Durchlässigkeit für Eiweiß befanden, da die nächsten Filter der Serie

mit etwas größerer Porengröße (3 %) auch für Eiweiß durchlässig waren. Die 1,5 %igen Filter ließen sämtliche Serumbestandteile quantitativ durch. Sämtliche Versuche wurden mehreremal wiederholt, die ganz eindeutigen Resultate sind im folgenden wiedergegeben.

Es wurden dreierlei Sera filtriert: normale Sera, Sera mit erhöhtem Bilirubinwert, jedoch mit indirekter Diazoreaktion, und direkt reagierende ikterische Sera.

Versuch 1. Normalsera. Das Ultrafiltrat war wasserklar und farblos. Der Filtrationsrückstand im Verhältnis zum Ausgangsserum in bezug auf Bilirubin deutlich konzentrierter. Die Konzentrierung war in bezug auf die Farbtiefe bereits beim einfachen Vergleich ganz offenbar.

Versuch 2. Indirekt reagierende Sera mit erhöhtem Bilirubinwert: Filtrat klar und farblos. Filtrationsrückstand konzentriert.

Versuch 3. Direkt reagierende Sera: Filtrat klar und farblos, deutliche Konzentrierung.

Wir erhielten zwar beim Gebrauch der etwas größeren Filter (3 %) bereits ein gelbes Ultrafiltrat, welches jedoch auch große Eiweißmengen enthielt. *Das Bilirubin der direkten Sera war daher nur mit Eiweiß zusammen filtrierbar und erschien im Ultrafiltrat bei derselben Porengröße wie das Eiweiß.*

Die Resultate der dritten Gruppe widersprachen so der allgemeinen auf der Literatur fußenden Meinung, sowie unserer eigenen Erwartung, da sie die Annahme einer einfach kristalloiden Lösungsform sogar des direkten Bilirubins unmöglich machten.

Die Erklärung dieses Befundes suchend, wurden Duodenalgalle und bilirubinhaltiger Urin ultrafiltriert.

Versuch 4. Duodenalgalle: Filtrat klar und farblos. Deutliche Konzentrierung.

Versuch 5. Bilirubinhaltiger Urin: tiefgelbes Filtrat, deutlicher grüner Ring, mit der Jodtinktur Reaktion. Keine Konzentrierung.

Die Durchsicht dieser Resultate zeigt, daß von unseren Versuchsobjekten *diejenigen physiologischen Flüssigkeiten, die Eiweiß (Sera) oder eiweißartige Substanzen (Duodenalsaft) enthalten, die Filtration ihres Bilirubingehaltes trotz direkter Diazoreaktion gänzlich vereiteln — dagegen der Urin, welcher Eiweiß nur in vernachlässigbaren Spuren enthält, sich in bezug auf die Bilirubinreaktion ebenso verhält wie eine künstliche Lösung.*

Diese Annahme konnte durch folgenden Versuch bewiesen werden:

Versuch 6. Zu einem direkt reagierenden Serum wurde eine künstliche Lösung von Bilirubin zugesetzt und so ultrafiltriert. *Das Filtrat war wasserklar und farblos.*

Versuch 7. Zum Filtrat des Versuches 6 wurde eine künstliche Bilirubinlösung zugesetzt und abermals ultrafiltriert. Das Filtrat war tief gelb.

Es wurde hiermit bewiesen, daß durch den Zusatz einer sonst gut filtrierbaren Bilirubinlösung zu einem direkt reagierenden Serum die Filtration des Bilirubins verhindert wird, also *das Serum die Fähigkeit besitzt, außer des eigenen hohen Bilirubins noch weiteres, künstlich zugesetztes Bilirubin unfiltrierbar zu gestalten. Diese Fähigkeit geht durch Ultrafiltration verloren, ist daher dem Ultrafiltrationsrückstand des Versuchs Nr. 5 zuzuschreiben.*

So wurden wir zu der Annahme gezwungen, daß die Verhinderung der Filtration des sonst gut filtrierbaren Bilirubins dem Eiweiße bzw. den eiweißartigen Substanzen zuzuschreiben ist, was auf folgende Weise bewiesen werden konnte:

Versuch 8. Es wurde aus Eiereiweiß mit physiologischer Kochsalzlösung eine Lösung hergestellt, deren Eiweißgehalt dem des Serums ungefähr entsprach. Zu dieser Lösung wurde eine künstliche Bilirubinlösung zugesetzt, gut vermischt und ultrafiltriert. Das Filtrat war wasserklar und farblos. Konzentrierung deutlich.

Die filtrationshindernde Wirkung bereits kleiner Eiweißmengen beweist *Versuch 9.* Es wurde ein mit physiologischer Kochsalzlösung auf das 20fache verdünntes Meerschweinchenserum zu einer künstlichen Bilirubinlösung zugesetzt, vermischt und ultrafiltriert. Das Filtrat war wasserklar und farblos.

Zwecks Entscheidung der Frage, ob die filtrationshemmende Fähigkeit nur den eiweißhaltigen Substanzen oder auch anderen Kolloiden zukommt, haben wir im

Versuch 10 Gummiarabikumlösung — also eine kolloidale Kohlehydratlösung — einer künstlichen Bilirubinlösung zugesetzt, vermischt und ultrafiltriert. Das Filtrat war wasserklar und farblos.

Kristalloide Lösungen in der zur physiologisch naheliegenden Konzentration (*Versuch 11*) hinderten die Bilirubinfiltration nie.

Wenn wir unsere Resultate überblicken, so ist aus denselben folgendes ersichtlich:

Eine künstliche Bilirubinlösung ist eine kristalloide Lösung, die durch sämtliche *Bechhold'sche* Ultrafilter filtrierbar ist. Ebenso verhält sich auch der Bilirubin enthaltende Urin. Sera und Duodenalsäfte, die Eiweiß oder eiweißartige Substanzen enthalten, hindern die Ultrafiltration sowohl eigener, wie zugesetzter künstlicher Bilirubinlösungen. Diese filtrationshemmende Wirkung filtrierbarer Substanzen muß also den unfiltrierbaren Eiweißbestandteilen zugeschrieben werden, da das Ultrafiltrat der Eiweiß enthaltenden Körperflüssigkeiten die weitere Ultrafiltration zugesetzter künstlicher Bilirubinlösung nicht hemmt. Die filtrationshemmende Wirkung kommt auch anderen Kolloiden zu, ist daher keine spezifische Eiweißwirkung, sondern ein Kolloideffekt. Ein weiterer Beweis, daß diese hemmende Wirkung den Kolloiden zuzuschreiben ist, ist auch die Tatsache, daß die Filtrabilitätsgrenze des

Bilirubins und Eiweißes — zweier Substanzen mit so verschiedener Teilchengröße — zusammenfällt.

Auf Grund unserer Versuche können wir daher eine weitere Differenzierung unserer Versuchsobjekte vornehmen. Die direkt reagierenden Flüssigkeiten, so direkte Sera, Duodenalsäfte, bilirubinhaltiger Urin und künstliche Bilirubinlösung, also chemisch — und zwar der Diazo-reaktion gegenüber — sich analog verhaltende Bilirubinlösungen können *physikalisch weiter differenziert werden*, indem direkte Sera und Duodenalsaft in bezug auf die Filtrierbarkeit von den künstlichen Bilirubinlösungen und bilirubinhaltigem Urin abweichen und sich so wie indirekte Sera verhalten. *Es ist daher das Bilirubin der direkten Sera sowie der Duodenalsäfte durch Kolloide gebunden.*

II.

Es wurde im vorangehenden gezeigt, daß das Bilirubin in den kolloidhaltigen Flüssigkeiten seine kristalloide Natur einbüßt, seine Ultrafiltrierbarkeit verliert. Als Ursache dieser Veränderung im physikalischen Verhalten müsse eine Bindung durch Kolloide angesehen werden. Es war nur fraglich, ob es möglich ist, diese Bindung zu lösen.

Adler und *Strauß* ist es gelungen, durch verschiedene Eingriffe eine Beschleunigung der Diazo-reaktion und sogar eine Änderung des Reaktions-typus hervorzurufen. Die deutlichsten Resultate konnten mit Novasurol und Coffein erzielt werden. Es handelte sich um physiko-chemische Zustands-änderungen der Sera, und zwar — wie es aus den Untersuchungen *Ellingers* (6) hervorgeht — um quellungsherabsetzende bzw. viskositäts-mindernde Wirkungen, an welche auch die diuretische Wirkung derselben geknüpft ist.

Da durch diese Substanzen, die im kolloidalen Milieu des Serums eine physikalisch-chemische Veränderung hervorriefen, gleichzeitig eine Veränderung im chemischen Verhalten des Bilirubins dem Diazo-reagens gegenüber erreicht werden konnte, lag der Gedanke nahe, daß die tiefgreifende Veränderung im kolloidalen Milieu auch auf die physikalische Beschaffenheit des Bilirubins bezüglich der Ultrafiltration einen deutlichen Einfluß ausüben könnte.

Um diese Annahme zu bestätigen, wurden bilirubinhaltige kolloide Lösungen mit Zusatz von Coffeinum natriobenzoicum filtriert.

In allen Fällen wurde eine 20 %ige wässrige Lösung von Coffeinum natriobenzoicum mit der zu untersuchenden Lösung zu gleichen Teilen verwendet.

Versuch 12. Indirekte Sera + Coffein. Das Ultrafiltrat deutlich gelb.

Versuch 13. Direkte Sera + Coffein. Das Filtrat tief gelb.

Versuch 14. Duodenalsäfte + Coffein. Das Filtrat tief gelb.

Versuch 15. Künstliche Bilirubinlösung mit Eiweiß (wie im Versuch 8) + Coffein. Das Ultrafiltrat deutlich gelb.

Versuch 16. Künstliche Bilirubinlösung + Gummiarabikum + Coffein. Das Ultrafiltrat gelb.

Sämtliche kolloidale Lösungen, und zwar sowohl Körperflüssigkeiten (direkte und indirekte Sera, Duodenalsäfte) wie auch künstliche Lösungen (künstliche Bilirubinlösung mit Eiweiß oder mit Gummiarabikum), die die Bilirubinfiltration vollständig verhinderten, ergaben auf Coffeinzusatz ein deutlich gelbes Filtrat, welches eine prompte Diazoreaktion zeigte. In keinem Filtrat war Eiweiß nachweisbar.

Das Coffein bewirkt also die Beseitigung der Bindung des Bilirubins durch die Kolloide.

Zusammenfassung.

1. Es wurden bilirubinhaltige Körperflüssigkeiten und künstliche Bilirubinlösungen ultrafiltriert. Sämtliche kolloidhaltige Lösungen zeigten eine vollständige Verhinderung der Filtration des sonst ultrafiltrierbaren Bilirubins.

2. Chemisch — der Diazoreaktion gegenüber — sich analog verhaltende Bilirubinlösungen können physikalisch weiter differenziert werden, indem direkt reagierende Sera und Duodenalsäfte die Ultrafiltration ihres sowie eines zugesetzten Bilirubins verhindern, während bilirubinhaltiger Urin und nicht kolloidhaltige künstliche Bilirubinlösungen filtrierbar sind.

3. Die Verhinderung der Ultrafiltration ist den Kolloiden zuzuschreiben.

4. Die Bindung des Bilirubins durch Kolloide kann durch Coffein behoben werden.

Literatur.

1) *Feigl und Quarner*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **9**, 153, 1919; *Rosenthal und Holzer*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **185**, 257, 1921. — 2) *Tannhäuser und Andersen*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **187**, 179, 1921. — 3) *Leschke*, Berl. klin. Wochenschr. 1921, S. 848. — 4) *Adler und Strauß*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **44**, 1, 1925. — 5) *Piotrowsky*, Arch. des maladies de l'appareil digestif et de la nutrition **15**, Nr. 8. — 6) *Ellinger*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 6.

Über die Zersetzlichkeit von Bilirubinlösungen, zugleich ein Beitrag zum Bilirubinnachweis im Urin.

Von

R. Sivó und E. Forrai.

(Mitteilung aus der III. medizinischen Klinik der k. u. Pázmány-Péter-Universität der Wissenschaften in Budapest.)

(Eingegangen am 28. Juli 1927.)

Neben der Gelbfärbung der Haut und Schleimhäute ist die Bilirubinurie eines der augenfälligsten Symptome des Ikterus. Bekanntlich erscheint bei einer Hyperbilirubinämie mit direkter Diazoreaktion oberhalb des Nierenschwellenwertes von etwa 4 mg-% das Bilirubin im Urin. Bei beginnender Gelbsucht kann dieser Schwellenwert bereits überschritten sein und das Bilirubin im Urin erscheinen, lange bevor die Haut und Skleren eine Spur von Ikterus erkennen lassen. Für das Sichtbarwerden des Ikterus der Haut spielt wahrscheinlich neben der Konzentration des Bilirubins im Blute auch die spezifische Durchlässigkeit der Gefäßendothelien eine Rolle. Andererseits kann bei abklingendem Ikterus trotz Abfall des Blutbilirubins unter den genannten Schwellenwert und fehlenden Harnbilirubins die Hautfärbung noch vorhanden sein, da die Gewebe den Farbstoff relativ lange festhalten [Schürer (1)]. Die Hautverfärbung ist daher kein Maß der Hyperbilirubinämie, dagegen kann die Bilirubinurie in der Nähe des Schwellenwertes wichtige Schlüsse auf Art und Grad der Hyperbilirubinämie ergeben, ohne die umständlichere Methode der Blutuntersuchung heranziehen zu müssen. Der zweifellose Nachweis des Bilirubins im Urin hat naturgemäß seine besondere Wichtigkeit in der Nähe des Schwellenwertes, wo der Urin die augenfälligen Eigenschaften des schwer ikterischen Urins (malzbierartige Farbe, gelber Schüttelschaum) noch nicht zeigt.

I.

Die allgemein angewandte, auch von uns gebrauchte und der *Gmelinschen* Probe an Empfindlichkeit überlegene *Trousseau-Dumont-pellier-Rosinsche* Reaktion besteht im Übersichten des Harns mit zehnfach verdünnter Jodtinktur, Auftreten eines grünen Ringes an der Berührungsstelle. Obwohl die Reaktion an Empfindlichkeit nichts zu wünschen übrig läßt, fiel uns eine sich öfters wiederholende Inkongruenz zwischen den Resultaten der Serumbilirubin- und Urinuntersuchungen auf. Von derselben Erfahrung berichtet *Meulengracht* (2), der bei leichtem, manchmal sogar bei deutlichem Ikterus im Urin eine negative oder höchst zweifelhafte Bilirubinreaktion erhielt, trotz ziemlich dunkler Urinverfärbung. Diese Inkongruenz führte uns zur Überprüfung der Reaktion. Bei Arbeiten mit künstlichen Bilirubinlösungen zeigte sich eine auffallend rasche Zersetzlichkeit, es lag daher nahe, den Grund der obigen Inkongruenz in der eventuellen Dekomposition zu suchen. Es wurde bilirubinhaltiger Urin unter verschiedenen Verhältnissen untersucht.

Versuch 1. a) Malzbierfarbiger, tiefikterischer Urin im Finstern aufbewahrt, zeigt nach 24 Stunden eine positive, nach 48 Stunden dagegen eine negative Jodreaktion. Die Verfärbung des Urins ist nach 48 Stunden deutlich grün, ein Beweis der stattgefundenen Zersetzung.

b) Derselbe Urin im Schatten aufbewahrt zeigt bereits nach 3 Stunden einen grünen Einschlag, Jodreaktion jedoch noch positiv. Nach 24 Stunden zweifelhafte Reaktion, in 48 Stunden negative Reaktion, grüne Verfärbung.

c) Derselbe Urin dem Sonnenlicht ausgesetzt zeigt in 1 Stunde 15 Minuten bereits grüne Verfärbung und negative Jodreaktion, also vollständige Zersetzung.

Versuch 2. a) Urin von einem leichten Ikterusfall — Serumbilirubin in der Nähe des Schwellenwertes (5,11 mg-%) — im frischen Zustande deutliche Jodreaktion, im Finstern aufbewahrt nach 24 Stunden negative Reaktion.

b) Derselbe Urin im Schatten aufbewahrt in 3 Stunden — negative Jodreaktion — vollständige Zersetzung.

c) Derselbe Urin dem Sonnenlicht ausgesetzt — nach 1 Stunde negative Jodreaktion — vollständige Zersetzung.

Um die eventuelle Rolle der Alkalität und Acidität bei der Zersetzung festzustellen, wurde in dem

Versuch 3a Urin I mit der gleichen Menge n/100 H_2SO_4 und im

Versuch 3b Urin I mit der gleichen Menge n/100 NaOH verdünnt und stehengelassen. Eine deutliche Änderung in der Schnelligkeit der Zersetzung konnte nicht nachgewiesen werden.

Es zeigte sich also, daß das Bilirubin eines grobikterischen Urins in der Finsternis und im Schatten in 48 Stunden, im Sonnenlicht bereits in 1 Stunde 15 Minuten vollständig zersetzt ist, jedoch das Bilirubin

eines Urins mit geringem Bilirubingehalt im Schatten bereits nach 3 Stunden, im Sonnenlichte schon nach einer Stunde der Zersetzung zum Opfer fällt.

Diese Befunde bestätigten die Annahme, daß die Inkongruenz der Serum- und Urinuntersuchungen mit der Zersetzung des Bilirubins erklärlich ist. *Es ist also angezeigt, um zweifellose Resultate zu erhalten, den Bilirubinnachweis stets im frischen Urin anzustellen.*

II.

Der raschen Dekomposition der künstlichen Bilirubinlösungen sowie bilirubinhaltiger Urine steht die ziemliche Haltbarkeit des Bilirubins in Seren gegenüber. *Lepehne* (3) veröffentlicht in ikterischen Seren von Tag zu Tag durchgeführte quantitative Bestimmungen, nach welchen er in zwei bis fünf Tagen einen Bilirubinverlust von 20 bis 50 % fand. Die mehrtägige Haltbarkeit, der 1½stündigen Dekomposition gegenübergestellt, deutet auf eine Ursache, die in der Verschiedenheit des Milieus zu suchen ist. Die wichtigste Differenz schien uns in der kolloiden Natur der haltbaren gegenüber der kristalloiden Natur der zersetzlichen Lösungen gegeben zu sein. Um die Kolloidwirkung auf die Zersetzlichkeit nachzuprüfen, wurde im

Versuch 4 das Ultrafiltrat eines Serums zu gleichen Teilen mit einer künstlichen Bilirubinlösung vermischt und stehengelassen. Nach 12 Stunden vollständige Zersetzung, grüne Verfärbung, negative Diazoreaktion.

Das Ultrafiltrat eines Serums besitzt daher nicht mehr die Fähigkeit, die Zersetzung des Bilirubins zu verhindern.

Versuch 5. Eine künstliche Bilirubinlösung mit Eiweiß vermischt, und zwar in verschiedenen Quantitäten von 20:1 bis 1:1 und stehengelassen. Die als Kontrolle dienende reine Bilirubinlösung war in 24 Stunden quantitativ zersetzt, während die eiweißhaltigen Lösungen noch nach 48 Stunden deutliche Jodreaktion zeigten.

Im *Versuch 6* wurde Versuch 5 mit bilirubinhaltigem, stark ikterischem Urin wiederholt. Nach 24 Stunden Jodreaktion überall, jedoch eine grüne Verfärbung des als Kontrolle dienenden Urins. Nach 48 Stunden ist der Kontrollurin grün, Jodreaktion negativ, die eiweißhaltigen Urine goldgelb, Jodreaktion überall positiv.

Es zeigte sich also, daß schon ziemlich kleine Eiweißmengen imstande sind, die Zersetzung des Bilirubins so in künstlichen Lösungen wie auch im Urin zu verhindern.

Die im vorangehenden veröffentlichten Versuche über die Ultrafiltrierbarkeit künstlicher und physiologischer Bilirubinlösungen zeigen eine vollkommene Übereinstimmung mit der Zersetzlichkeit derselben, indem die Gruppe der ultrafiltrierbaren Bilirubinlösungen (künstliche Lösung, Urin) eine rasche Zersetzlichkeit, während nicht ultrafiltrierbare Bilirubinlösungen (normale Sera, indirekte und direkte hyperbilirubinämische Sera) eine bei weitem längere Haltbarkeit zeigen. Dieselben

physikalischen Faktoren, welche die Ultrafiltrierbarkeit des Bilirubins verhindern — Bindung durch Kolloide —, schützen dasselbe vor der Zersetzung.

Zusammenfassung.

1. Bilirubinnachweis im Urin ist wegen Zersetzlichkeit des Bilirubins stets frisch vorzunehmen.
2. Die Bindung durch Kolloide verlängert die Haltbarkeit der Bilirubinlösungen.

Literatur.

- 1) *Schürer*, Deutsch. med. Wochenschr. 1922, S. 593. — 2) *Meulengracht*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 182, 286, 1920. — 3) *Lepehne*, ebendasselbst 182, 96, 1920.
-

Über die Wirkung der durchdringenden Radiumstrahlung auf Pseudoglobulin.

Von

A. Fernau (Wien).

(Aus der Radiumstation der Universitätsklinik für Dermatologie und Syphilidologie in Wien.)

(Eingegangen am 29. Juli 1927.)

In einer Reihe von Arbeiten wurde von *Pauli* und *Fernau*¹ über die Wirkung der durchdringenden Radiumstrahlung auf Serum- und Ovalbumin berichtet. Es konnten schon nach siebenstündiger Bestrahlung Zustandsänderungen des Serumalbumins in der augenscheinlich noch unveränderten, klaren Lösung an der Erniedrigung der Gerinnungstemperatur und Erhöhung der Alkoholfällbarkeit festgestellt werden, während eine Trübung erst nach mehreren Tagen sichtbar war. Nach mehrwöchentlicher Bestrahlung war das Serumalbumin vollständig ausgeflockt. Salzzusatz verlängert die zur Flockung nötige Bestrahlungsdauer, hinreichender Salzzusatz verhindert dieselbe vollständig. Ovalbumin zeigte sich ebenso empfindlich gegen Strahlen, doch war kein Strahlenschutz durch Salz feststellbar, die zur beginnenden Flockung nötige Bestrahlungsdauer war in der salzfreien und 0,5 n Salz enthaltenden Flüssigkeit die gleiche.

Diese Verschiedenheit im Verhalten von Serum- und Ovalbumin gab Veranlassung, auch das *Pseudoglobulin* auf seine Veränderung durch β -Strahlung zu untersuchen.

Die nach mehrwöchentlicher, gewöhnlicher Vordialyse im *Pauli*-schen Elektrodialysator von Salzen vollkommen befreite Pseudoglobulinlösung hatte eine Konzentration von 3,15 %. 2 ccm der Lösung wurden in einen etwa 6 ccm fassenden Glaszylinder gebracht und das 70 mg Radiumelement in Form von 180 mg Radiumbariumcarbonat enthaltende Glasröhrchen von 0,3 mm Wandstärke in die Flüssigkeit eingesenkt, um eine möglichst intensive β -Strahlung einwirken zu lassen. Zum Schutze gegen Bakterien- und Pilzwuchs und dadurch

¹ *Fernau* und *Pauli*, diese Zeitschr. 70, 426, 1915; Kolloidzeitschr. 20, 1917; 30, 1922; *Fernau*, diese Zeitschr. 167, 380, 1926.

verursachtes Alkalischeswerden der Lösung war eine etwa 5 mm hohe Toluoldecke aufgeschichtet.

Es sei auch an dieser Stelle die Beobachtung wiederholt, daß die γ -Strahlung als solche kaum eine Wirkung auf Eiweiß auslöst, sondern nur primäre oder von der γ -Strahlung im durchstrahlten Medium hervorgerufene sekundäre β -Strahlung.

In folgender Tabelle sind die Resultate zusammengestellt:

Pseudoglobulin, Leitfähigkeit $k = 8,10 \cdot 10^{-6}$.

Konzentration %	K Cl	Bestrahlungsdauer bis zur beginnenden Trübung
1,0	—	5 Tage
1,58	—	$55\frac{1}{3}$ "
3,16	—	5 "
3,16	0,05 n	8 "
3,16	0,10 n	8 "
3,16	0,50 n	12 "
6,32	—	12 "

Wird die Lösung nach der beginnenden Flockung weiter bestrahlt, so tritt zunächst die Trübung in dem Teile der Flüssigkeit, welcher das das Radiumsalz enthaltende Röhrchen umgibt, deutlicher hervor; das Pseudoglobulin setzt sich allmählich schwerpulvrig ab und die überstehende Flüssigkeit ist fast klar. Nach etwa 3 Wochen war das Pseudoglobulin bis auf 0,1 % ausgefällt. An der Außenwand des Radiumröhrchens, im Bereich intensivster Einstrahlung, hatte sich eine glashelle, gelbliche, gelatinöse Masse angelagert, welche in Wasser unlöslich, hingegen in 0,01 n Lauge löslich war. Der durch Bestrahlung verursachte Denaturierungsvorgang war auch, wie es bei Serum- und Eialbumin der Fall ist, in der noch anscheinend klaren Lösung an der Erniedrigung der Gerinnungstemperatur nachweisbar. Nach vier-tägiger Bestrahlung war die Gerinnungstemperatur einer 1,58- bzw. 3,16 %igen Pseudoglobulinlösung von ursprünglich 61,5° C auf 57° C erniedrigt.

Eine Erhöhung der Leitfähigkeit als Folge der Bestrahlung war nicht mit Sicherheit feststellbar. Die Leitfähigkeit der 8 Monate in einem Jenakolben unter Toluol gehaltenen Vorratslösung war spontan von $8 \cdot 10^{-6}$ auf 10^{-4} angestiegen. Die Lösung war offenbar durch Auslaugen von Glassubstanz und trotz Toluolschutzes alkalisch geworden.

Es wurde auch die 4 %ige, der gewöhnlichen Dialyse unterworfenen Pseudoglobulinlösung, von welcher ein Teil vor 8 Monaten zur vollständigen Befreiung von Elektrolyten der Elektrodialyse unterworfen

worden war, der Einwirkung von β -Strahlung ausgesetzt. Die Leitfähigkeit dieser Vorratslösung war in 8 Monaten von $7 \cdot 10^{-5}$ auf $6 \cdot 10^{-4}$ gestiegen, die Gerinnungstemperatur mit $61,5^{\circ}\text{C}$ gleich geblieben. Beginnende Trübung trat nach achttägiger Bestrahlung ein. Nach viertägiger Bestrahlungsdauer war Trübung schon beim Erhitzen auf 57°C zu beobachten. Wurde die Bestrahlung fortgesetzt, so erwies sich das Filtrat nach etwa 26 Tagen als fast frei von Pseudoglobulin.

Konzentration o/o	KCl	Bestrahlungsdauer bis zur beginnenden Trübung
1	—	8 Tage
2	—	8 "
4	—	8 "
4	0,05 n	8 "
4	0,10 n	9 "
4	0,50 n	12 "

Im allgemeinen verhielt sich diese der gewöhnlichen Dialyse unterzogene Pseudoglobulinlösung der durch die Elektrodialyse vollkommen salzfreien ähnlich. Die zur beginnenden Flockung nötige Bestrahlungsdauer war nicht nur vom Salzzusatz, sondern anscheinend auch von der Konzentration der Lösung beeinflusst.

Die Frage der Abhängigkeit der zur beginnenden augenscheinlichen Ausflockung nötigen Bestrahlungsdauer von der Konzentration der Eiweißlösung ist noch nicht zuverlässig geklärt und Gegenstand einer eigenen gegenwärtig laufenden Untersuchung. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß offenbar durch Mikroorganismen hervorgerufenen Alkalischeswerden der Pseudoglobulinlösung (Abbau unter Abspaltung von Ammoniakspuren) die Flockung verzögern oder ganz verhindern kann. Die Gefahr der Einwanderung von Mikroorganismen ist beim Verdünnen der Stammlösung immer vorhanden, weshalb die Bestrahlungsversuche bei einer Temperatur unter 5°C durchzuführen sind.

Zur Beobachtung des Verlaufs der Denaturierung wurde wie bei Serum- und Eialbumin die Bestimmung der Gerinnungstemperatur herangezogen. Pseudoglobulin gestattet jedoch keine so scharfe Bestimmung desselben. Der Verlauf des Denaturierungsvorganges, das erste Auftreten von denaturierten Teilchen, ist durch ultramikroskopische Beobachtung¹ schärfer feststellbar als durch die augenscheinliche Beobachtung einer Trübung. Versuche, den zeitlichen Verlauf der Denaturierung durch β -Strahlung mittels des Ultramikroskops zu verfolgen, sind im Gange und werden demnächst veröffentlicht.

¹ Nakashima, Strahlentherapie **24**, 1926.

Über den Stoffwechsel der Leber in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung.

Von

Chichio Tamiya.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 29. Juli 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Frage, wie sich der Stoffwechsel differenzierter Körpergewebe im Laufe ihrer Entwicklung ändert, ist bisher nicht näher untersucht worden. Ich habe mich auf Vorschlag von Herrn Warburg mit dieser Frage beschäftigt und als Versuchsobjekt Hühnerleber gewählt, weil embryonale Leber von Hühnern leicht zu beschaffen ist.

Die geeignetsten Stadien erhält man von Hühnerembryonen des fünften bis achten Bebrütungstages. Das Gewicht der Lebern beträgt in dieser Zeit 0,05 bis 2 mg (trocken), ist also so klein, daß die ganzen Organe zur Stoffwechselmessung verwendet werden können. In späteren Stadien müssen die Organe für die Stoffwechselmessung in Schnitte zerlegt werden. Wegen der weichen Konsistenz der embryonalen Leber ist dies im Embryonalzustand schwer, während Leber von erwachsenen Hühnern ohne Schwierigkeit dünn geschnitten werden kann.

Ich habe mich unter diesen Umständen auf die Zeit des fünften bis achten Bebrütungstages beschränkt, eine Zeit, in der die Leber sehr stark wächst und ihr Gewicht verzwanzigfacht. Zum Vergleich habe ich Leber von erwachsenen, etwa 1 Jahr alten Hühnern benutzt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle I und Abbildung 1 zusammengestellt und beziehen sich sämtlich auf den Stoffwechsel in Hühnerserum (nicht in Ringerlösung). Wie man aus der Tabelle sieht, ändert

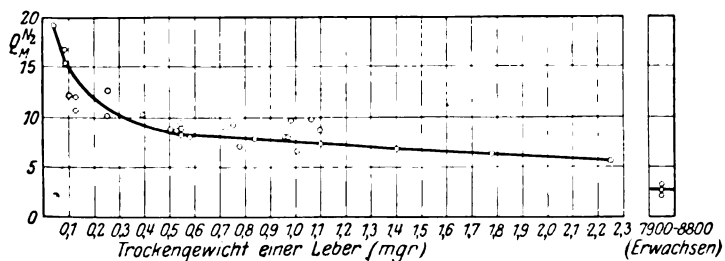


Abb. 1.

Tabelle I. Stoffwechsel von Hühnerlebern in Hühnerserum. 38°.

Bebrütungs- tag	Trockengewicht einer Leber	I.	II.	III.	IV.
		Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$	U
5.	0,048			+ 19,0	
5.	0,087			+ 16,7	
5.	0,093			+ 15,2	
5.	0,103			+ 12,1	
5.	0,128			+ 12,0	
5.	0,131	— 15,4	+ 1,3	+ 10,7	— 20,1
5.	0,260			+ 10,0	
6.	0,263			+ 12,6	
6.	0,398			+ 10,1	
6.	0,507			+ 8,7	
6.	0,533			+ 8,5	
6.	0,540			+ 8,8	
7.	0,545			+ 8,4	
6.	0,547			+ 9,4	
6.	0,580	— 13,7	0	+ 8,0	— 19,4
7.	0,720			+ 8,6	
8.	0,755			+ 9,1	
7.	0,780			+ 7,0	
8.	0,840			+ 7,9	
7.	0,960	— 12,1	0	+ 8,0	— 16,2
6.	0,960			+ 8,0	
8.	0,980			+ 9,7	
7.	1,030			+ 6,6	
8.	1,060			+ 9,9	
8.	1,090			+ 8,7	
8.	1,100			+ 7,2	
8.	1,400			+ 6,8	
7.	1,770			+ 6,2	
8.	2,250			+ 5,7	
Erwachsen (etwa 1 Jahr alt)	7900	— 14,4	0	+ 2,1	— 26,7
	7950			+ 2,7	
				+ 3,1	+ 2,8
				+ 2,6	
				+ 3,4	
	8800	— 14,6	0	+ 3,4	— 25,8
				+ 3,5	

sich die Atmung (Q_{O_2}) im Laufe der Entwicklung nur unwesentlich. Die anaerobe Glykolyse ($Q_M^{N_2}$) jedoch ist am Anfang der Entwicklung größer als im erwachsenen Zustande, nämlich, wenn man Anfangs- und Endzustand vergleicht, fünf- bis siebenmal größer.

Immer war die doppelte Atmung größer als die anaerobe Glykolyse, der Gärungsüberschuß¹

$$U = Q_M^{N_2} - |2 Q_{O_2}|$$

also negativ.

¹ O. Warburg, Über die Klassifizierung der Gewebe nach ihrem Stoffwechsel, diese Zeitschr. 184, 484, 1927.

Versuchsordnung.

Das Milieu, in dem der Stoffwechsel gemessen wurde, war frisches Hühnerserum, das durch Zentrifugieren des spontan geronnenen Blutes gewonnen war. Es enthielt in 100 ccm 200 bis 250 mg Glucose.

Die Stoffwechselmessungen wurden nach den Vorschriften ausgeführt, die Warburg¹ für Serum angegeben hat.

Die Messungen begannen 15 Minuten nach dem Einhängen der Gefäße in den Thermostaten. Im allgemeinen wurde nur die anaerobe Glykolyse gemessen, in 5 % Kohlensäure, 95 % Stickstoff (über Kupfer geglüht).

Sollte auch die Atmung gemessen werden, so wurde dasselbe Gewebestück hintereinander unter aeroben Bedingungen (5 % Kohlensäure, 95 % Sauerstoff) bei variiertem Serumvolumen und dann unter anaeroben Bedingungen untersucht.

Präparierung der embryonalen Leber.

Man präpariert in Hühnerserum, das mit 5%iger Kohlensäure gesättigt ist, bringt den Embryo in das Serum, entfernt die Fruchthülle, schneidet den Kopfteil ab, hält den Rumpf in Rückenlage, faßt das Herz mit einer Pinzette und klappt es kranialwärts um. Dann sieht man die Leber neben dem weißen Magen und Duodenum liegen, als gelbgefärbtes, mehr oder weniger mit Blutgefäßen versorgtes Organ. Am fünften Bebrütungstage ist die Leber ein kleines Körnchen, eine Differenzierung in Lappen ist erst vom sechsten Bebrütungstage an erkennbar.

Protokolle.

Protokoll 1. Anaerobe Glykolyse $Q_M^{N_2}$ der embryonalen Leber am fünften Bebrütungstage in frischem Hühnerserum (5% CO_2 in N_2 , 37,5° C).

Gasvolumina v_G . ccm	3,76	3,99	3,62
Serumvolumina v_F ccm	0,5	0,5	0,5
$k_{CO_2}^{Ringer}$	0,358	0,378	0,346
$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M$	0,194	0,192	0,190
k_M^{Serum}	0,455	0,474	0,441
Zahl d. Lebern pro Gefäß	5	3	6
Gesamtrockengewicht der Lebern . . . mg	0,240	0,28	0,62
Trockengewicht einer Leber mg	0,048	0,093	0,103
Druckänderung	mm	mm	mm
in 10'	+ 2,0	+ 1,5	+ 3,5
" 10'	+ 2,0	+ 1,5	+ 2,0
" 10'	+ 1,0	+ 1,5	+ 3,0
$Q_M^{N_2}$	+ 19,0	+ 15,2	+ 12,1

¹ O. Warburg, Manometrische Messung des Zellstoffwechsels im Serum, diese Zeitschr. 164, 481, 1925.

Protokoll 2.

Anaerobe Glykolyse $Q_M^{N_2}$ der erwachsenen Leber in frischem Hühnerserum
(5% CO₂ in N₂, bei 37,5° C).

	Huhn I	Huhn II	Huhn III
Gasvolumina v_G . ccm	3,70	3,76	3,76
Serumvolumina v_F ccm	0,5	0,5	0,5
$k_{CO_2}^{Ringer}$	0,353	0,358	0,358
$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M$	0,080	0,167	0,148
k_M^{Serum}	0,393	0,442	0,432
Schnittgewicht . . . mg	2,45	7,42	4,86
Trockengewicht einer ganzen Leber . . . mg	7900	7950	8000
Druckänderung	$\left. \begin{array}{l} \text{in } 10' + 2,5 \\ \text{'' } 10' + 2,0 \\ \text{'' } 10' + 2,0 \end{array} \right\} + 6,5$	$\left. \begin{array}{l} \text{in } 15' + 13,0 \\ \text{'' } 15' + 10,0 \end{array} \right\} + 23,0$	$\left. \begin{array}{l} \text{in } 10' + 7,0 \\ \text{'' } 10' + 6,0 \\ \text{'' } 10' + 6,0 \end{array} \right\} + 19,0$
$Q_M^{N_2}$	+ 2,1	+ 2,7	+ 3,4

Protokoll 3.

Atmung und Glykolyse der embryonalen Leber (fünfter Bebrütungstag)
in frischem Hühnerserum. $B_0 = 585$, 37,5° C, Trockengewicht 1,05 mg
(8 Lebern).

$v_F = 1,5$ ccm $v_G = 2,70$ ccm (5% CO ₂ in O ₂) $K_{O_2} = 0,242$ $k_{CO_2}^{Ringer} = 0,319$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_G = 0,0854$ für $\Delta p \sim 76$ mm $K_{CO_2}^{Serum} = 0,447$	$v_F = 0,5$ ccm $v_G = 3,70$ ccm [5% CO ₂ in N ₂] $k_{CO_2}^{Ringer} = 0,353$ $k_M^{Serum} = 0,430$
Druckänderung H mm in 10' - 4,5 " 10' - 4,5	Druckänderung mm in 10' + 4,5 " 10' + 4,5 " 10' + 4,5
$v_F = 0,5$ ccm $v_G = 3,70$ ccm (5% CO ₂ in O ₂) $k_{O_2} = 0,327$ $k_{CO_2}^{Ringer} = 0,353$ $k_{CO_2}^{Serum} = 0,396$	$Q_{O_2} = -15,4$ $Q_S^{O_2} = +16,7$ $Q_M^{O_2} = +1,3$ $Q_M^{N_2} = +10,7$ $\bar{U} = -20,1$
Druckänderung h mm in 10' - 1,0 " 10' - 0,5	

Protokoll 4.

Atmung und Glykolyse der erwachsenen Leber in frischem Hühnerserum.

$B_0 = 642$, $37,5^\circ\text{C}$, Trockengewicht des Lebergewebes = $2,45$ mg.

$v_F = 1,5$ ccm $v_G = 2,70$ ccm (5% CO_2 in O_2) $K_{\text{O}_2} = 0,242$ $k_{\text{CO}_2}^{\text{Ringer}} = 0,319$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_C = 0,048$ für $\Delta p \sim 71$ mm $K_{\text{CO}_2}^{\text{Serum}} = 0,391$	$v_F = 0,5$ ccm $v_G = 3,70$ ccm [5% CO_2 in N_2] $k_{\text{CO}_2}^{\text{Ringer}} = 0,353$ $k_{\text{CO}_2}^{\text{Serum}} = 0,393$
Druckänderung H mm in 10' — 12,0 " 10' — 12,0	Druckänderung mm in 10' + 2,5 " 10' + 2,0 " 10' + 2,0
$v_F = 0,5$ ccm $v_G = 3,70$ ccm (5% CO_2 in O_2) $k_{\text{O}_2} = 0,327$ $k_{\text{CO}_2}^{\text{Ringer}} = 0,353$ $k_{\text{CO}_2}^{\text{Serum}} = 0,377$	$Q_{\text{O}_2} = -14,4$ $Q_{\text{S}}^{\text{O}_2} = +11,5$ $Q_{\text{M}}^{\text{O}_2} = 0$ $Q_{\text{M}}^{\text{N}_2} = +2,1$ $\bar{U} = -26,7$
Druckänderung h mm in 10' — 5,5 " 10' — 5,0	

Zur Kenntnis des D-Vitasterins.

I. Mitteilung:

Über die Aktivierbarkeit des Cholesterins.

Von

A. Jendrassik und A. G. Keményfi.

(Aus der Zentral-Untersuchungsstation des Königl. Ung. Ministeriums für
Arbeitswesen und Volkswohlfahrt.)

(Eingegangen am 31. Juli 1927.)

Es ist aus der Literatur bekannt, daß bestrahltes Cholesterin einen hohen Grad von Aktivität zeigt, man konnte aber eine äußere Veränderung des Stoffes nicht wahrnehmen. Zwar konnte eine Erniedrigung des Schmelzpunktes beobachtet werden, und *Beumer* (1) fand, daß das bestrahlte Cholesterin durch Digitonin nicht quantitativ fällbar ist, doch schien das Cholesterin nach der Bestrahlung in seiner Hauptmasse unverändert.

Nun konnte angenommen werden, daß die aktive Substanz nur einen geringen Teil des bestrahlten Cholesterins darstellt und daß Versuche, die Trennung dieser aktiven Substanz von der Hauptmasse des Cholesterins zu erzwingen, gelingen müßten.

Hess (2) fand — in Tierversuchen — den durch Digitonin unfällbaren Anteil des bestrahlten Cholesterins inaktiv. *Rosenheim* und *Webster* (3) konnten aber ein hochwirksames Produkt mit dieser Methode erzielen, wenn die Bestrahlung in Stickstoffatmosphäre ausgeführt wurde.

Die letztgenannten Forscher versuchten, die Trennung auch auf rein physikalischem Wege zu erreichen, und zwar durch kombinierte fraktionierte Kristallisation des bestrahlten Cholesterins aus Petroläther und aus Alkohol. Sie konnten aber nur in dem Falle eine teilweise Heilung erzielen, wenn die Bestrahlung des Cholesterins in Stickstoffatmosphäre ausgeführt worden war. Da durch die Versuche von *Rosenheim* und *Webster* die Möglichkeit der Fraktionierung des bestrahlten Cholesterins nicht vollständig klar gestellt wurde, und da die kombinierte Verwendung von zwei verschiedenen Lösungsmitteln den Überblick verwirrten und die Verhältnisse komplizierten, haben wir in unseren Untersuchungen die Fraktionierung auf neue versucht.

J. C. Drumond verwendete mit Erfolg bei der Trennung der aktiven Substanz vom Cholesterin im unverseifbaren Anteil des Dorschlebertranöls die Fraktionierung mittels Methylalkohol.

So lag der Gedanke nahe, bei unseren Untersuchungen auch Methylalkohol zu verwenden. Da aber die Löslichkeitsverhältnisse des Cholesterins beim Äthylalkohol für unsere Zwecke noch günstiger erschienen, so wählten wir für unsere Versuche Äthylalkohol als Lösungsmittel. Tatsächlich ist es uns gelungen, in Luftatmosphäre bestrahltes Cholesterin durch Fraktionierung mittels Äthylalkohol in zwei Teile zu scheiden und aus der Mutterlauge einen gelblichen, schwach aromatisch riechenden Anteil abzusondern, welcher etwa 20 % des angewendeten Cholesterins ausmachte und sich in Tierversuchen gegenüber dem Ausgangsmaterial durch dreifache Wirksamkeit auszeichnete.

Inzwischen erschien die bedeutende Arbeit *A. Windaus'* (4) und seiner Mitarbeiter, in welcher dargelegt wurde, daß das Ergosterin dem Cholesterin gegenüber eine vielfache Aktivierbarkeit aufweist, und sie gelangten unter anderem zu der Folgerung: daß chemisch ganz reines Cholesterin nicht mehr aktivierbar sei, sondern die Aktivierbarkeit des gewöhnlichen Cholesterins *immer nur durch Ergosterin-Verunreinigungen* verursacht wurde.

Windaus' Argumente, die sich auf die letztere Behauptung beziehen, erschienen uns nicht ganz belegt und wir glaubten in unserem oben genannten Fraktionierungsverfahren eine Methode zu besitzen, mit der wir die Richtigkeit der Behauptungen *Windaus'* bestätigen wollten. Zu dem Zweck haben wir folgende Versuche ausgeführt:

Zuerst wollten wir durch eigene Untersuchungen die Aktivierbarkeit des Cholesterins prüfen, und so haben wir gewöhnliches Handelscholesterin (*A. F. Kahlbaum*) fünfmal aus 96 % igem Alkohol umkristallisiert und aus einer Entfernung von 35 cm mit einer Hanauer Quarzlampe von 3000 Kerzen 1 Stunde lang bestrahlt. Das Cholesterin wurde in einer so dünnen Schicht ausgebreitet, daß auf jeden Quadratzentimeter bestrahlter Oberfläche 0,01 g Cholesterin kam.

Dieses so bestrahlte Cholesterin wurde nach dem *Mac Collum*schen sogenannten „line test“ im Tierversuch geprüft, bei dem wir uns folgender Arbeitsmethode bedienten: 27 bis 51 g wiegende junge weiße Ratten hielten wir auf einer Rachitis erzeugenden Grunddiät, welche die untenstehende Zusammensetzung hatte:

- 33 Teile Weizen,
- 33 „ Gelber Mais,
- 15 „ Weizenkleber,
- 5 „ Gelatine (*Merck*),
- 10 „ Reismehl (von geschältem Reis),
- 1 Teil NaCl,
- 3 Teile CaCO₃.

Diese Grunddiät ist ähnlich der Diät Nr. 3143 von *Mac Collum*, unterscheidet sich aber von letzterer dadurch, daß sie statt 15 Teile Gelatine 10 Teile geschälten Reismehls und nur 5 Teile Gelatine enthält; dies ist nach *Dr. Bosányi*s und unseren Beobachtungen zur sicheren und zeitlich genauen Erzeugung von Rachitis bei weißen Ratten günstiger (was wahrscheinlich

auf den niedrigeren Phosphorgehalt dieser Diät zurückzuführen ist). Nach Verlauf von 4 Wochen, als die Rachitis der Tiere schon durch äußere Kennzeichen wahrnehmbar war, setzten wir zu der obengenannten Grunddiät den zu untersuchenden Stoff zu und verabreichten den Ratten diese Mischung eine Woche lang.

Selbstverständlich haben wir auch Kontrolltiere verwendet, welche auch während der fünften Woche nur die Grunddiät bekommen haben. Nach Verlauf der fünften Woche wurden sämtliche Tiere getötet, das Femur auspräpariert und der Schnitt der *Mac Collum*schen Vorschrift gemäß in Silbernitratlösung mit einem binokularen Mikroskop untersucht.

Um die Wirkungsfähigkeit des bestrahlten Cholesterins mit dem des *Ol. jecoris aselli* zu vergleichen, haben wir auch mit Dorschlebertranöl Versuche angestellt. Die Resultate beider Versuche sind aus der ersten Tabelle ersichtlich.

Nachdem die Aktivierbarkeit des uns zur Verfügung stehenden Cholesterins festgestellt war, wendeten wir uns zur Fraktionierung des Cholesterins. Wir haben Handelscholesterin unter den obengenannten Versuchsbedingungen umkristallisiert und bestrahlt, dann die bestrahlte Substanz in 16 Gewichtsteilen — auf 70° erwärmten — Alkohol gelöst und, nachdem die Lösung sich auf 20° abgekühlt hatte, die Mutterlauge von den ausgeschiedenen Kristallen getrennt. Nachdem die Mutterlauge von den Kristallen (Präparat Nr. 3) völlig abgenutzt war, wurde sie im Vakuum eingedampft (Präparat Nr. 2).

Die so gewonnenen Präparate wurden im Tierversuch geprüft und die Versuchsergebnisse sind in Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I.

Nr.	Geschlecht des Ver- suchstieres	Zusatz zur Grund- nahrung nach 4 Wochen	Anfangs- gewicht	Gewicht nach 4 Wochen	Gewicht nach 5 Wochen	Line test	Bemerkungen
224	♂	—	43	70	73	—	Rachitis
236	♀	—	47	71	73	—	"
225	♂	Ol. jec. aselli	46	73	79	++++	Gute Heilung
233	♀		47	79	88	++++	"
226	♂	Präparat Nr. 1	45	68	74	++++	Vollständige Heilung
239	♀	8 mg pro die	36	57	61	++++	Gute Heilung
228	♂	Präparat Nr. 1	48	73	81	++	Schwache Ablagerung
235	♀	2 mg pro die	44	69	78	+++	"
229	♂	Präparat Nr. 2	41	67	75	++++	Vollständige Heilung
240	♀	3 mg pro die	41	69	73	+++	Mäßige Ablagerung
230	♂	Präparat Nr. 2	51	93	99	++	Schwache Ablagerung
234	♀	0.8 mg pro die	44	72	77	++++	Gute Heilung
232	♂	Präparat Nr. 3	36	51	53	+++	Schwache Ablagerung
238	♀	8 mg pro die	38	61	67	++	"

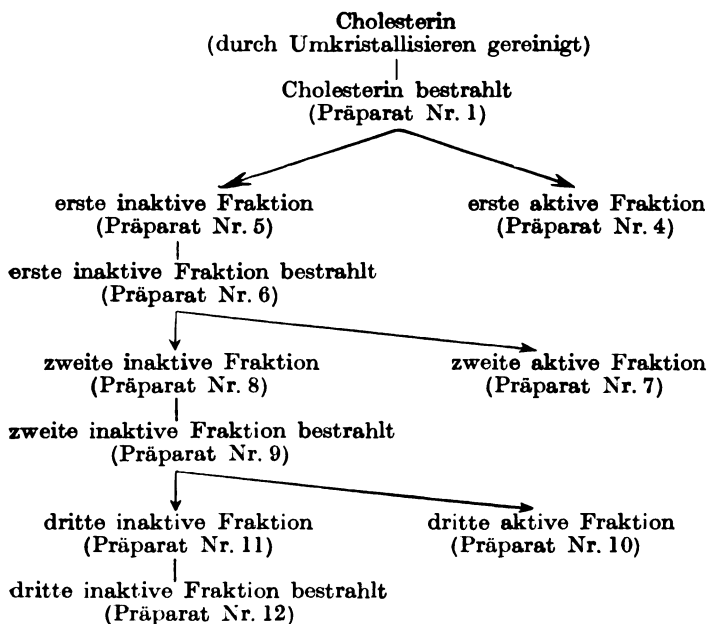
Wie ersichtlich, fanden wir in diesem unseren *ersten Fraktionierungsversuch* noch Aktivität besitzende Kristalle, obwohl das Filtrat eine *größere* Aktivität zeigte als die ausgeschiedenen Kristalle.

Um die *völlige* Entfernung der aktiven Substanz zu erreichen, wiederholten wir den obigen Versuch, dadurch modifiziert, daß die ausgeschiedenen

Kristalle nach Absaugen der Mutterlauge noch dreimal mit je 4 Gewichtsteilen Alkohol gewaschen wurden. Es gelang durch diese Methode, völlig inaktive Kristalle zu gewinnen (neben aktivem Filtrat), wie das aus der Tabelle II ersichtlich ist (Präparat Nr. 5). Das so gewonnene inaktive Präparat erneut bestrahlt, ergab wieder ein aktives Produkt (Präparat Nr. 6, Tabelle II).

Da wir in diesen Versuchen gesehen haben, daß nach dem Entfernen der aktiven Substanz das zurückbleibende inaktive Produkt durch Bestrahlen wieder aktiviert werden kann, haben wir die gleichen Fraktionierungsoperationen fortgesetzt.

Wir haben die Fraktionierung und Bestrahlung nach obigen Versuchsbedingungen viermal nacheinander durchgeführt. Das Verfahren kann durch folgendes Schema veranschaulicht werden:



Wie aus Tabelle II hervorgeht, konnten wir durch diese Fraktionierung dreimal nacheinander das Cholesterin vom aktiven Material befreien und jedesmal neben einem aktiven Anteil einen inaktiven Anteil gewinnen, welcher jedesmal auch nach der vierten Fraktionierung noch immer aktivierbar war.

Da uns diese Versuche gezeigt haben, daß es nicht möglich ist (wie nach *Windaus'* Anschauungen zu erwarten wäre) durch Bestrahlung und Fraktionieren aus Cholesterin die aktivierbare Substanz (das Provitamin) zu entfernen, haben wir uns bemüht, einige Versuche von *Windaus* nachzuprüfen; Versuche, die er zum Beweis der Theorie anführte, daß das Cholesterin nur dadurch aktivierbar sei, weil jedes

Tabelle II.

Nr.	Geschlecht des Ver- suchstieres	Zusatz zur Grund- nahrung nach 4 Wochen	Anfangs- gewicht	Gewicht nach 4 Wochen	Gewicht nach 5 Wochen	Line test	Bemerkungen
245	♂	—	45	82	87	—	Rachitis
246	—	—	40	69	72	—	"
275	—	—	34	55	57	—	"
279	—	—	33	57	59	—	"
258	—	—	28	48	50	—	"
227	♂	Präparat Nr. 4	32	53	62	+++++	Völlige Heilung
237	♀	8 mg pro die	39	58	66	+++++	Gute Heilung
242	♀	Präparat Nr. 5	44	72	78	—	Rachitis
249	♀	16 mg pro die	47	83	85	—	"
243	♀	Präparat Nr. 6	38	58	64	+++	Gute Heilung
248	♂	8 mg pro die	46	88	92	+++++	"
257	♀	—	34	48	52	+++	"
262	♀	Präparat Nr. 7	34	56	61	+++++	"
284	♀	8 mg pro die	38	64	73	+++	"
283	♀	—	28	59	61	+++++	"
260	♀	Präparat Nr. 8	39	65	69	—	Rachitis
261	♀	24 mg pro die	44	68	70	—	"
259	♀	Präparat Nr. 9	39	63	64	+++++	Gute Heilung
256	♀	8 mg pro die	34	64	67	+++++	"
276	♀	Präparat Nr. 10	34	66	69	+++	Mäßige Ablagerung
278	♀	8 mg pro die	32	56	66	+++++	Gute Heilung
277	♀	Präparat Nr. 11	34	62	74	+	Rachitis
272	♂	16 mg pro die	38	64	73	—	"
280	♀	Präparat Nr. 12	38	64	73	+++	Gute Heilung
282	♀	8 mg pro die	28	59	61	+++++	"

Cholesterin als Beimengung und Verunreinigung Ergosterin enthält, die der alleinige aktivierbare Stoff — das Provitamin — wäre.

Einer der Versuche, welcher durch *Windaus* als Beweis der obgenannten Theorie angeführt wurde, ist folgender: Zur Entfernung des Provitamins (Ergosterins) wurde Cholesterin bromiert und die gewonnenen Bromprodukte mittels Zinkstaub reduziert. Das so erzielte Reduktionsprodukt, welches alle charakteristischen Merkmale des Cholesterins zeigte, konnte *Windaus* durch Bestrahlen nicht mehr aktivieren.

Da wir über die Versuchsbedingungen, unter welchen die Bromierung und die Reduktion durchgeführt wurden, keine Angaben finden konnten, haben wir die Bromierung sowohl nach der Methode von *Lischütz* (5) wie nach der von *Windaus* (6) durchgeführt.

Die benutzte Bromierungsmethode von *Lischütz* war folgende: 20 g Cholesterin wurden in 200 ccm Äther gelöst und mit 10 g in 90 ccm Äther frisch gelösten Broms vermischt. Die in wenigen Minuten hellrötlich-gelb gewordene klare Lösung wurde mit zweifachem Volumen 90 %igen Alkohols vermischt. In kurzer Zeit erstarrte das Gemisch zu einem fast steifen Brei

weißer Nadeln. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden abgesaugt und mit wenig 90%igem Alkohol gewaschen.

Die benutzte Bromierungsmethode von *Windaus* war folgende: Zu einer Lösung von 50 g Cholesterin in 50 ccm Äther wurde eine Lösung von 25 g Brom in 250 ccm Eisessig gelöst zugesetzt. Nach einigen Minuten erstarrte die Lösung zu einem Kristallbrei, aus nadelförmigen, gelblichen Kristallen bestehend. Die Kristalle wurden abgenutscht und mittels Eisessig eingewaschen. Die so erhaltenen Dibromcholesterine wurden nach vorsichtigem Trocknen durch Zinkstaub nach folgender Methode reduziert: 20 g Cholesterindibromid wurden in 300 g Eisessig gelöst und allmählich 40 g Zinkstaub zugesetzt. Nach späterem Zusatz von 20 g Wasser wurde das Reaktionsgemisch in einem mit Rückflußkühler versehenen Kolben 12 Stunden lang gekocht. Nach dem Erkalten wurden 300 ccm Wasser zugegeben und das sich ausscheidende Produkt mit Äther ausgeschüttelt und dann mit Kalilauge enthaltendem Wasser mehrmals ausgewaschen. Nachdem der Äther abdestilliert war, wurde das zurückbleibende Produkt in Alkohol gelöst und — nach Zugabe des gleichen Volumens Wasser — das ausgeschiedene Produkt abgenutscht. Die schwachgelben Kristalle wurden mit 20%iger alkoholischer Kalilauge unter Rückfluß 6 Stunden lang verseift, das ausgeschiedene Produkt nach Zugabe von Wasser abgenutscht und aus Alkohol mehrmals umkristallisiert. Die so gewonnenen Cholesterine wurden (aus später anzuführenden Gründen) mit Wasser behandelt, d. h. zweimal auf dem Wasserbade mit wässrigem Alkohol eingedampft. Nach dieser Operation wurden die Produkte, die sowohl durch ihr Aussehen, wie auch durch ihre physikalischen Konstanten sich als Cholesterin zeigten, 1 Stunde lang bestrahlt und im Tierversuch geprüft. (Präparat Nr. 13 nach *Lischütz*; Präparat Nr. 14 nach *Windaus*.)

Wie aus der Tabelle III ersichtlich, kamen wir auf das überraschende Resultat, daß sowohl das nach der Methode von *Lischütz*, wie auch das nach der Methode von *Windaus* bromierte und nachher reduzierte Cholesterin sich nach Bestrahlung als aktiv erwies.

Wir haben auch einen anderen Versuch *Windaus'* aufs neue unternommen, und zwar haben wir Cholesterin in alkoholischer Lösung mit Blutkohle unter Rückflußkühler gekocht und nach Abfiltrieren der

Tabelle III.

Nr.	Geschlecht des Ver- suchstieres	Zusatz zur Grund- nahrung nach 4 Wochen	Anfangs- gewicht	Gewicht nach 4 Wochen	Gewicht nach 5 Wochen	Line test	Bemerkungen
255	♂	—	50	80	90	—	Rachitis
250	♂	—	33	54	58	—	"
252	♀	—	40	68	73	++++	Gute Heilung
254	♀	{ Präparat Nr. 13 } 16 mg pro die	27	48	50	+++	Mäßige Ablagerung
267	♀		33	49	54	++++	Gute Heilung
273	♀	{ Präparat Nr. 14 } 16 mg pro die	36	67	68	+++	Mäßige Ablagerung
274	♀		32	56	58	+++	Gute Heilung
244	♀	{ Präparat Nr. 15 } 8 mg pro die	32	62	66	+	Rachitis
247	♀		41	72	76	+	Schwache Ablagerung

Blutkohle die alkoholische Lösung eingedampft, dann das so gewonnene Cholesterin bestrahlt (Präparat 15). Die Tierversuche (Tabelle III) zeigten aber negative Resultate und so fanden wir in diesem Versuch — übereinstimmend mit *Windaus* — daß das mit Blutkohle in alkoholischer Lösung gekochte Cholesterin seine Aktivierbarkeit verloren hatte.

Nach diesen Untersuchungen versuchten wir *Windaus'* glänzende Erfolge, welche er durch Bestrahlung von Ergosterin erzielte, zu bestätigen. Zuerst haben wir nach seiner Methode (6) Ergosterin aus Hefe dargestellt und in festem Zustande in dünner Schicht 1 Stunde lang aus 30 cm Entfernung bestrahlt (Präparat Nr. 16) und im Tierversuch in Dosen von $\frac{1}{100}$ mg pro die geprüft. Wir konnten sehen, daß tatsächlich Ergosterin in Dosen von $\frac{1}{100}$ mg pro die äußerst aktiv wirkt und sogar Dosen von $\frac{1}{200}$ und $\frac{1}{1000}$ mg pro die eine ausreichende Aktivität besitzen, wie das aus der Tabelle IV ersichtlich ist.

Tabelle IV.

Nr.	Geschlecht des Ver- suchstieres	Zusatz zur Grund- nahrung nach 4 Wochen	Anfangs- gewicht	Gewicht nach 4 Wochen	Gewicht nach 5 Wochen	Line test	Bemerkungen
264	♂	—	30	52	56	—	Rachitis
265	♀	—	33	81	89	—	"
251	♀	} Präparat Nr. 16 { 0,01 mg pro die	40	68	73	++++	Gute Heilung
253	♀		38	65	70	++++	Völlige Heilung
281	♀		31	55	58	++++	Gute Heilung
270	♀	} Präparat Nr. 16 { 0,005 mg pro die	35	59	70	++++	Völlige Heilung
262	♀		30	58	59	++++	Gute Heilung
263	♀		30	63	66	+++	Mäßige Ablagerung
266	♀	} Präparat Nr. 16 { 0,001 mg pro die	37	69	76	++	Schwache Ablagerung
268	♀		37	71	78	+++	"
269	♀		35	52	50	+	Rachitis

Durch die oben geschilderten Untersuchungen können wir die *Windausschen* Resultate, die Aktivierbarkeit des Ergosterins betreffend, vollauf bestätigen, da es uns gelang, übereinstimmend mit *Windaus*, durch aus Hefe dargestelltes — eine Stunde lang aus 30 cm Entfernung in fester Form und bei Luftzutritt bestrahltes — Ergosterin in Dosen von $\frac{1}{100}$ mg pro die eine völlige Heilung rachitischer Ratten in einer Woche zu erzielen.

Weiter konnten wir erneut feststellen, daß ebenso behandeltes Ergosterin sogar in Dosen von $\frac{1}{200}$ und $\frac{1}{1000}$ mg pro die eine teilweise Heilung hervorzurufen imstande war.

Unsere Untersuchungen mit Ergosterin haben die Angaben *Windaus'* vollständig übereinstimmend bestätigt, wir können uns aber — im Hinblick auf unsere anderen Resultate — den Nebenfolgerungen *Windaus'* über die Aktivierbarkeit des Cholesterins nicht anschließen. *Windaus* behauptet, daß Cholesterin *immer nur* dann eine Aktivierbarkeit

besitzt, wenn es — nur auf physikalischem Wege gereinigt — Ergosterin als Beimengung oder Verunreinigung enthält. Dieser Behauptung können wir uns nicht anschließen.

Bei dem Versuch mittels Blutkohle, den wir nach den Versuchsbedingungen *Windaus'* wiederholt haben, erhielten wir zwar mit dem Befund *Windaus'* übereinstimmende Resultate, doch möchten wir auch auf eine annehmbare Erklärung hinweisen über die Nichtaktivierbarkeit eines so behandelten Cholesterins. Wie aus den Untersuchungen von *Bills* (8) hervorgeht, besitzt gelöstes Cholesterin die Eigenschaft, sich sehr leicht zu verändern, wenn es mit Stoffen von großer Oberfläche gekocht wird.

Dagegen zeigten unsere Bromierungsversuche — im Gegensatz zu *Windaus'* negativen Resultaten — das Ergebnis, daß das durch Bromierung und nachfolgende Reduktion erhaltene — gereinigte — Cholesterin Aktivierbarkeit besitzt. Obzwar das Ergosterin durch Bromierung irreversibel zerstört wird, haben unsere Versuche gezeigt, daß durch Bromierung von Ergosterin, oder von Provitamin befreites Cholesterin noch immer aktivierbar ist. Durch die oben geschilderten Fraktionierungsversuche wollten wir einen Beitrag an *Windaus'* Provitamintheorie anreihen. Wir fanden aber, daß sogar nach viermal nacheinander ausgeführtem völligen Entfernen der aktiven Substanz, der jeweils inaktiv zurückgebliebene Anteil noch immer aktivierbar war. Die Resultate dieser beiden Versuche, nämlich die Bromierungsversuche und die Fraktionierungsversuche, können mit der Theorie von präformiertem Provitamin im Cholesterin nicht gut in Einklang gebracht werden.

Auch verschiedene andere Untersuchungen widersprechen der Theorie, daß das Cholesterin nur dadurch aktivierbar sei, weil ein jedes Cholesterin Ergosterin als Beimengung enthält.

Die Untersuchungen von *Steenbock* und *Black* (9) zeigten, daß aktiviertes Cholesterin durch Benzoylierung mit Benzoylchlorid und Pyridin und nachfolgendem Ausscheiden mit Wasser und zweimaligem Umkristallisieren aus Äthylalkohol inaktiv ist. Wenn das Benzoat mit kochender alkoholischer Kalilauge verseift wurde, war das erhaltene Cholesterin noch immer inaktiv. Wenn man dagegen dieses Produkt in Ätherlösung bestrahlte, so erhielt man wieder ein aktives Präparat.

Dieser Versuch ist eigentlich mit unseren Fraktionierungsverfahren insofern identisch, weil auch in diesem Versuch die aktive Substanz entfernt wird und trotzdem die Aktivierbarkeit erhalten bleibt.

Windaus und *R. Pohl* (10) fanden, daß der einzige Unterschied zwischen dem physiologisch wirksamen — und unwirksamen (gereinigten) Cholesterin — in einer stärkeren Ultraviolettabsorption

zwischen 280 bis 300 $\mu\mu$ des letzteren besteht (welche Absorption nach *R. Pohl* (11) mit dem des Ergosterins identisch ist).

F. W. Schlutz und *M. R. Ziegler* (12) gelang es demgegenüber festzustellen, daß bezüglich der Ultraviolettabsorption das Cholesterin sich in zwei Modifikationen zeigt:

1. Ist Cholesterin sorgfältig von dem sogenannten Kristallwasser befreit, so sind die charakteristischen Absorptionsbänder zwischen 280 bis 300 $\mu\mu$ eines so behandelten Cholesterins nicht mehr vorhanden, und nur eine allgemeine Absorption läßt sich beobachten.

2. Nach Eindampfen mit Wasser können die verschwundenen Absorptionsbänder wieder hervorgerufen werden.

So konnte gezeigt werden, daß ein vorher nur allgemeine Absorption zeigendes Cholesterin durch eine einfache Wasserbehandlung die charakteristische Absorptionsbänder wieder erhält, welche nach *Windaus* und *R. Pohl* die Aktivierbarkeit, d. h. den Provitamingehalt des Cholesterins anzeigen sollen.

Sowohl die angeführten, wie die eigenen Ergebnisse finden in der Theorie von *Windaus* keine völlige Erklärung. Eine andere Annahme in der sowohl obgenannte Untersuchungen, sowie auch die von uns durchgeführten eine ausreichende Auslegung erhalten würden, scheint uns das Folgende zu sein:

Auch durch unsere Fraktionierungsversuche kann als festgestellt betrachtet werden, daß das Cholesterin nicht als solches bei der Bestrahlung aktiviert wird, sondern nur ein unbestimmter Anteil, welcher sich in dem aktivierbaren Cholesterin vorfindet.

Die Entdeckung *Windaus'*, daß das Ergosterin einen sehr hohen Grad von Aktivierbarkeit besitzt, legte die Vermutung nahe, daß das Provitamin Ergosterin sei. Aber die Annahme, daß der in dem Cholesterin befindliche — die Aktivierbarkeit des Cholesterins verursachende — Stoff als *Verunreinigung* in dem Cholesterin vorkommt, und weiter, daß nach Entfernen oder Zerstören dieser Substanz die Aktivierbarkeit des Cholesterins unwiderruflich verloren gegangen wäre, müssen wir als nicht richtig betrachten.

Wir wollen nun den Versuch unternehmen, eine mehr befriedigende Theorie aufzustellen. Wenn wir annehmen, daß das Cholesterin (wenn es das sogenannte Kristallwasser enthält) in gewissem Maße eine Umwandlung erfährt (welche Umwandlung aber nur bis zu einem gewissen Gleichgewicht vor sich geht und durch die das Provitamin entsteht), dann glauben wir alle scheinbar einander widersprechenden Ergebnisse erklären zu können.

Indem wir diese Vermutung aussprechen, wollen wir es durchaus nicht behaupten, daß Provitamin nicht Ergosterin, oder ein dem Ergosterin ähnlicher Stoff sei. Im Gegenteil sprechen auch unsere mit Ergo-

sterin ausgeführten Versuche dafür, welche die hohe Aktivierbarkeit des Ergosterins bestätigen. Wir müssen nur die Theorie eines *beigemischten* Provitamins fallen lassen und dagegen die Theorie eines sich aus dem Cholesterin *bildenden* Provitamins einsetzen.

Durch die Annahme, daß Provitamin aus sogenanntes Kristallwasser enthaltendem Cholesterin sich nach Entfernen oder Zerstören immer neu bilden kann, sind wir in der Lage, die verschiedenen Resultate folgendermaßen zu erklären.

1. Provitamin bildet sich aus Cholesterin durch Umwandlung.
2. Nur solches Cholesterin, das nicht vollständig wasserfrei ist, kann Provitamin enthalten.
3. Durch Entziehung der letzten Spuren von Wasser aus Cholesterin wird das vorhandene Provitamin zerstört und die Möglichkeit einer Neubildung so lange ausgeschlossen, als das Cholesterin wasserfrei bleibt. Ein solches Cholesterin zeigt nur ein allgemeines Absorptionsspektrum, und die charakteristischen Absorptionsbänder zwischen 280 bis 300 $m\mu$ sind nicht vorzufinden.
4. Nach Entfernung des Provitamins aus dem Cholesterin — gleichgültig, ob auf chemischem oder physikalischem Wege, bleibt die Möglichkeit einer Neubildung vorhanden.

Die Fraktionierungsversuche bestätigen diese Annahme. Sie zeigen, daß das Cholesterin nur teilweise aktivierbar ist; nach Entfernen der aktiven Substanz bleibt eine völlig inaktive Substanz zurück, welche aber immer noch Aktivierbarkeit besitzt, die nach unseren Anschauungen durch den Umstand ausgelegt werden kann, daß die Entfernung des präformierten Provitamins durch Bestrahlung und Fraktionierung das Gleichgewicht zwischen Provitamin und Cholesterin stört und so die Möglichkeit einer Neubildung gegeben wird.

Die Annahme, daß durch die Bestrahlung nur ein Teil des aktivierbaren Stoffes — des Provitamins — verbraucht werde, können wir mit dem Resultat widerlegen, daß sogar nach viermal nacheinander durchgeführten Fraktionierungen die dritte inaktive Fraktion bestrahlt (vgl. Tabelle II, Präparat 12) nicht bemerkbar an Aktivierbarkeit einbüßte.

Der scheinbare Gegensatz zwischen den *Windausschen* und unseren Bromierungsversuchen könnte durch den Umstand erklärt werden, daß wir die nach Bromierung und Reduzierung erhaltenen Cholesterine mit Wasser behandelt haben, um durch diesen Umstand eine Provitaminbildung zu ermöglichen.

Als ein letztes Argument zur Bekräftigung unserer Vermutungen soll noch ein Versuch von *M. J. Shear* und *B. Kramer* (13) angeführt werden, in dem sie bei der fraktionierten Umkristallisation von Cholesterin aus Alkohol, auch nach dreizehnmaliger Umkristallisation aus

der Mutterlauge, eine gelbliche harzartige Substanz erhielten. Leider waren wir zurzeit nicht in der Lage, unsere Kontrollversuche, welche wir mittels vollständig wasserfreien Cholesterins ausführen wollten, anzustellen, da wir durch verschiedene äußere Umstände daran gehindert wurden. Auch waren wir genötigt, mangels eines Ultraspektroskops uns an Befunde anderer Autoren anzulehnen. Wir müssen daher diese Untersuchungen als vorläufige Mitteilungen betrachten und wollen hoffen, daß wir unsere Versuche fortsetzen und den völligen Beweis unserer Theorie bekanntgeben werden können.

Literatur.

- 1) *Beumer*, Münch. med. Wochensch. **72**, 1585, 1925. — 2) *A. F. Hess*, *M. Weinstock*, *Sherman*, Journ. biol. Chem. **67**, 413, 1926. — 3) *O. Rosenheim*, *T. A. Webster*, Biochem. Journ. **20**, 537, 1926. — 4) *A. Windaus*, *A. F. Hess*, Nachr. d. ges. Wiss. Göttingen **175**, 84, 1926. — 5) *Lifschütz*, Hoppe-Seyler **106**, 272, 1919. — 6) *A. Windaus*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **39**, 518, 4378, 1906. — 7) *A. Windaus*, *Grosskopf*, Hoppe-Seyler **124**, 8, 1922. — 8) *Ch. E. Bills*, Journ. biol. Chem. **67**, 753, 1926; **68**, 821 bis 831. — 9) *H. Steenbock*, *Black*, ebendasselbst **64**, 263, 1925. — 10) *R. Pohl*, Nachr. d. ges. Wiss. Göttingen 1926, S. 142 bis 145. — 11) *Derselbe*, ebendasselbst 1926, S. 185 bis 191. — 12) *F. W. Schlutz*, *M. R. Ziegler*, Journ. biol. Chem. **69**, 415, 1926. — 13) *M. J. Shear*, *B. Kramer*, ebendasselbst **71**, 213, 1926.

Eine Vervollständigung der Reihe Pufferlösungen im alkalischen Gebiet.

Von

J. M. Kolthoff und **J. J. Vleeschhouwer.**

(Mitteilung aus dem Pharmazeutischen Laboratorium der Reichsuniversität
Utrecht.)

(Eingegangen am 31. Juli 1927.)

Bekanntlich haben wir mehrere Reihen Pufferlösungen über ein p_H -Gebiet von 0 bis 10 zur Verfügung. Braucht man Lösungen mit einem p_H größer als 12, so kann man dieselben aus carbonatfreier Natronlauge herstellen und aus dem Ionenprodukt des Wassers das entsprechende p_H berechnen. Weil die Hydroxylionenkonzentration derartiger Lösungen sich praktisch nicht — das Löslichkeitsprodukt des Wassers sich dagegen sehr stark — mit der Temperatur ändert, haben derartige alkalische Lösungen einen großen Temperaturmodulus im p_H , und zwar nimmt der Wasserstoffexponent mit steigender Temperatur stark ab.

Für das p_H -Gebiet von 10 bis 12 haben wir keine anschließende Reihe von Pufferlösungen, wie das bei anderen p_H -Werten wohl der Fall ist. Zwar liegen im Schrifttum einige p_H -Messungen von Gemischen von sekundärem Natriumphosphat mit Natronlauge bzw. Carbonat-Bicarbonat vor¹, jedoch sind diese Reihen nicht systematisch ausgearbeitet. Wir haben daher die folgende Untersuchung angestellt, um die Lücke aufzufüllen.

Sehr geeignete Pufferlösungen mit einem p_H zwischen 11,0 bis 12,2 kann man sich aus 0,1 mol. sekundären Natriumphosphat und 0,1 mol. Natronlauge herstellen. Wir gingen von reinem sekundären Natriumphosphat von der Zusammenstellung $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ aus (Präparat

¹ Vgl. *J. M. Kolthoff*, Der Gebrauch von Farbindikatoren, 3. Aufl., S. 148.

von Prof. *Schoorl* hergestellt, sechsmal aus Wasser umkristallisiert. p_H der 0,1 mol. Lösung bei 18° 8,99, der 0,05 mol. Lösung 9,03, der 0,02 mol. Lösung 9,05). Die Natronlauge war in der üblichen Weise carbonatfrei erhalten. Weil die Phosphat-Laugegemische stark alkalisch reagieren, sind sie kohlenensäureempfindlich und müssen sie in gut verschlossenen Flaschen aufbewahrt werden.

Für das p_H -Gebiet von 9,2 bis 11,0 haben wir Natriumcarbonat-Boraxgemische hergestellt. Statt Borax kann man natürlich auch Natriumbicarbonat nehmen; weil Borax jedoch so leicht rein herzustellen ist, und die Lösung gut haltbar ist, haben wir letzterem Salz den Vorzug gegeben. Auch die Carbonat-Boraxlösungen müssen in gut verschlossenen Flaschen aufbewahrt werden¹. Bei den Messungen wurde der Wasserstoff in der üblichen Weise gereinigt und schließlich noch über die gleiche Pufferlösung geführt als die, welche gemessen wurde. Damals hat der eine von uns² eine Reihe Pufferlösungen mit einem p_H von 6 bis 8 beschrieben, welche durch Mischen von primärem Kaliumphosphat (KH_2PO_4) und Borax erhalten wurden. Bei der Berechnung der p_H -Werte hatten wir eine andere Formel benutzt als jetzt allgemein angenommen wird. Daher haben wir alle Messungen wiederholt und die Berechnung auf ein p_H im Standard-Salzsäuregemisch (0,01 n HCl + 0,09 n KCl) von 2,038 (*Sørensen*-Wert) bezogen. In der dritten Tabelle sind die Resultate der verbesserten Reihe angegeben.

Alle Messungen sind mit der Wasserstoffelektrode bei $18 \pm 0,1^\circ$ ausgeführt worden. Als Bezugselektrode ist die Chinhydronelektrode im Standard-Salzsäuregemisch verwendet. Jeden Tag wurde das Elektrodengefäß gereinigt und mit frischer Lösung und Chinhydron aufgefüllt.

Tabelle I.

Pufferlösungen aus 0,1 mol. Na_2HPO_4 und 0,1 n NaOH.
(Ausgangslösung enthält 35,82 g Na_2HPO_4 12 H_2O bzw. 26,82 g Na_2HPO_4 7 H_2O bzw. 17,81 g Na_2HPO_4 2 H_2O im Liter.)

Zusammensetzung der Lösung			p_H
25 ccm 0,1 mol. Phosphat	$\left\{ \begin{array}{l} + 4,13 \text{ ccm} \\ + 6,00 \text{ " } \\ + 8,67 \text{ " } \\ + 12,25 \text{ " } \\ + 16,65 \text{ " } \\ + 21,60 \text{ " } \end{array} \right\}$	0,1 n NaOH mit Wasser bis 50 ccm	11,60
			11,20
			11,40
			11,60
			11,80
			12,00

¹ Im Anschluß an unsere Reihe Puffertabletten von 3,0 bis 9,2 sind auch diese Pufferlösungen in Tablettenform zu beziehen bei den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin, Scharnhorststr. 22.

² Vgl. *J. M. Kolthoff*, Journ. biol. Chem. **63**, 135, 1925.

Tabelle II.

Pufferlösungen aus 0,05 mol. Soda- und 0,05 mol. Boraxlösung.
(Ausgangslösung enthält 5,300 g Na_2CO_3 bzw. 19,10 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ im Liter.)

Zusammensetzung der Lösung		p_{H}	Zusammensetzung der Lösung		p_{H}
Soda ccm	Borax ccm		Soda ccm	Borax ccm	
97,3	2,7	11,00	75,4	24,6	10,00
94,75	5,25	10,80	66,7	33,3	9,80
91,5	8,5	10,60	55,5	44,5	9,60
86,9	13,1	10,40	35,7	64,3	9,40
82,15	17,85	10,20	0	100,0	9,20

Tabelle III.

Pufferlösungen aus 0,1 mol. KH_2PO_4 - und 0,05 mol. Boraxlösung.
(Ausgangslösungen enthalten 13,62 g KH_2PO_4 bzw. 19,10 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ im Liter.)

Zusammensetzung der Lösung		p_{H}	Zusammensetzung der Lösung		p_{H}
KH_2PO_4 ccm	Borax ccm		KH_2PO_4 ccm	Borax ccm	
8,77	1,23	6,00	4,80	5,20	7,80
8,30	1,70	6,20	4,50	5,50	8,00
7,70	2,30	6,40	4,24	5,76	8,20
7,12	2,88	6,60	3,80	6,20	8,40
6,58	3,42	6,80	3,20	6,80	8,60
6,10	3,90	7,00	2,48	7,52	8,80
5,66	4,34	7,20	1,32	8,68	9,00
5,36	4,64	7,40	0,00	10,00	9,20
5,08	4,92	7,60			

Über den Stoffwechsel von Carcinomzellen in Carcinomserum und Normalserum.

Von

Hans Adolf Krebs und Fritz Kubowitz.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 2. August 1927.)

Nach *E. Freund* und *G. Kaminer*¹ und vielen anderen² hat normales Serum im Gegensatz zu dem Serum Carcinomkranker die Eigenschaft, Carcinomzellen aufzulösen. Träfe dies für lebende Carcinomzellen zu, so müßte der Stoffwechsel der Carcinomzellen in Normalserum verschwinden. Wir haben auf Vorschlag von Herrn *Warburg* den Stoffwechsel von Carcinomzellen in Normalserum und Carcinomserum gemessen und keine die Fehlergrenze überschreitenden Unterschiede gefunden. Normales Serum enthält also weder Substanzen, die lebende Carcinomzellen auflösen, noch Substanzen, die den Stoffwechsel von Carcinomzellen hemmen. Dies gilt sowohl für die menschlichen Spontancarcinome (in Menschenserum), als auch für das *Jensensche* Ratten-sarkom (in Rattenserum) und das *Roussarkom* (in Hühnerserum).

Vielfach haben wir auch den Stoffwechsel in Serum mit dem Stoffwechsel in Ringerlösung verglichen und auch hierbei keine wesentlichen Unterschiede gefunden. Insbesondere ist die Atmung der Carcinome in Serum nicht größer als in Ringerlösung.

Schließlich ist diese Arbeit ein Beitrag zu der Frage, ob sich menschliche Spontancarcinome anders³ oder ebenso verhalten wie transplantierte Ratten- und Hühnertumoren. Wir haben im ganzen 18

¹ *E. Freund* und *G. Kaminer*, diese Zeitschr. **26**, 312, 1910; **149**, 245, 1924.

² Neuere Arbeiten sind von *N. Waterman* und *L. de Kromme* (diese Zeitschr. **182**, 375, 1927 und **188**, 65, 1927, dort auch Literatur).

³ Daß sich die menschlichen Spontantumoren anders verhalten, vermuten *J. B. Murphy* und *J. A. Hawkins* (Journ. of Gen. Phys. **8**, 115, 1925) auf Grund von Versuchen mit Spontantumoren von Inzuchtmäusen. Versuche mit menschlichen Spontantumoren haben *Murphy* und *Hawkins* nicht ausgeführt.

menschliche Tumoren¹ untersucht, ohne besondere Auswahl der Fälle, jedoch unter histologischer Kontrolle des Materials. Sämtliche Messungen sind in den Tabellen I und II mitgeteilt. Von den 18 Fällen verhalten sich 17 wie transplantierte Ratten- und Hühnertumoren, ein Fall — eine maligne Struma — verhält sich insofern anders, als die Atmung im Vergleich zur (anaeroben) Gärung groß ist.

I. Methodisches.

Zur Serumgewinnung wurde menschliches Blut kurze Zeit vor Beginn der Stoffwechselmessung aus der Armvene entnommen und nach dem Gerinnen zentrifugiert. Von Ratten gewannen wir das Blut durch Punktion des Herzens, von Hühnern aus der Carotis durch Halsabschneiden. Alle Sera waren frisch, nicht inaktiviert.

Um Beeinflussungen des Stoffwechsels durch die Konzentrationen der Glucose und des Bicarbonats auszuschalten, haben wir den Seren jedesmal so viel Glucose hinzugefügt, daß die Glucosekonzentration etwa 0,20 bis 0,25 % betrug, und uns ferner jedesmal davon überzeugt, daß der Bicarbonatgehalt der Seren der physiologische war (rund $2,5 \cdot 10^{-2}$ mol.).

Die Gewebeschnitte stellten wir immer sofort nach der Entnahme des Tumors aus dem Körper her. Bei den menschlichen Tumoren wurde stets ein Gewebeteil, das dem zur Stoffwechselmessung verwendeten Stücke benachbart war, histologisch untersucht.

Die Stoffwechselmessung geschah nach den früher beschriebenen manometrischen Methoden². In einem Teile der Fälle wurde die anaerobe Gärung gemessen und längere Zeit hindurch, gewöhnlich 2 Stunden lang, beobachtet. In einem anderen Teile der Fälle wurden Atmung, aerobe und anaerobe Gärung gemessen, und zwar erfolgten die drei erforderlichen Messungen nacheinander am gleichen Schnitt in der aus Protokoll 1 und 3 (Abschnitt III) ersichtlichen Anordnung.

II. Ergebnisse.

Die Ergebnisse unserer Messungen stellen wir in den Tabellen I bis IV zusammen. Ausführliche Versuchsprotokolle mit experimentellen Einzelheiten sind in Abschnitt III wiedergegeben.

Außer dem bereits in der Einleitung Gesagten geht aus den Tabellen folgendes hervor:

¹ Den Herren Geheimrat *Hildebrand*, Geheimrat *Bier* und Prof. *v. Eicken* sprechen wir auch hier für die Überlassung des Materials aus ihren Kliniken vielen Dank aus.

² *O. Warburg*, Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926.

Tabelle I.
Atemung und Gärung menschlicher Carcinome in Carcinomserum* und Nicht-Carcinomserum.

Nr.	Material	Stoffwechsel in Carcinomserum					Stoffwechsel in Nicht-Carcinomserum				
		Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$	U	$\frac{U}{Q_M^{N_2}}$	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$	U	$\frac{U}{Q_M^{N_2}}$
1	Mammacarcinom, Scirrhus, 20 bis 40 % Carcinomzellen	-2,6	+	4,3	+	11,1	+	5,9	+	53 %	76 %
2	Lebermetastase eines Gallenblasencarcinoms, 10 bis 20 % Carcinomzellen	-1,1	+	7,8	+	13,6	+	11,4	+	84 %	16 %
3	Hautcarcinom, 50 bis 70 % Carcinomzellen	-3,1	+	6,8	+	13,8	+	7,6	+	55 %	46 %
4	Lippencarcinom, 50 bis 70 % Carcinomzellen**	-3,4	+	9,2	+	16,3	+	9,5	+	58 %	53 %
5	Struma maligna (Sarkom), fast 100 % Zellen	-6,9	+	11,1	+	15,8	+	2,0	+	—	—

* In Fall 3 und 4 stammte das Carcinomserum von demselben Kranken wie das Carcinom. — ** Hierzu Protokoll 1 in Abschnitt III.

1. Beim Jensensarkom, Rous-sarkom und bei der Mehrzahl der menschlichen Tumoren sind die Stoffwechselquotienten in Normalserum, Carcinomserum und Ringerlösung gleich oder nur unwesentlich verschieden. Bei einigen menschlichen Tumoren bestehen größere Unterschiede (z. B. Fall 4, 8, 9, 11, 16 der Tabelle II). Die Schwankungen gehen jedoch in den verschiedenen Fällen nach verschiedenen Richtungen. So ist beispielsweise in Fall 4 (Tabelle II) die anaerobe Gärung in Normalserum größer als in Carcinomserum und in Ringerlösung, in Fall 8 aber umgekehrt in Ringerlösung und in Carcinomserum größer als in Normalserum. Für die Beurteilung solcher Unterschiede muß man bedenken, daß es bei menschlichem Tumormaterial im allgemeinen schwierig ist, mehrere gleichartige Gewebeschnitte zu erhalten. Da die Qualität des Gewebes (Gehalt an Krebszellen, an Bindegewebe und Ursprungsgewebe) häufig selbst in nahe benachbarten Partien des Tumors sehr verschieden ist, so hängt es häufig nur vom Zufall ab, ob die verwendeten Schnitte gleichartig sind oder nicht. Die in einzelnen Fällen bestehenden Unterschiede lassen sich somit durch Unterschiede des Materials erklären und beweisen keine Unterschiede im Stoffwechsel der Krebszellen.

2. Berücksichtigt man den Zellgehalt der menschlichen Tu-

Tabelle II.

Anaerobe Gärung menschlicher Tumoren in Ringerlösung, Carcinomserum* und Nichtcarcinomserum.

Nr.	Material	$Q_M^{N_2}$ in Ringerlösung		$Q_M^{N_2}$ in Carcinomserum		$Q_M^{N_2}$ in Nicht- carcinomserum	
		1. Stde.	2. Stde.	1. Stde.	2. Stde.	1. Stde.	2. Stde.
1	Netzmetastase eines Magen- carcinoms, fast 100 % Car- cinomzellen, zahlreiche kleine Nekrosen	+ 14,5	+ 14,5	+ 13,6	+ 10,8	—	—
2	Mammacarcinom, medul- lärer Tumor, fast 100 % Carcinomzellen, kl. Nekrosen	+ 16,0	+ 14,3	—	—	+ 19,4	+ 10,9
3	Kehlkopfcarcinom, Platten- epithelcarcinom, etwa 50 bis 70 % Zellen	+ 18,0	—	+ 25,3	+ 21,2	+ 19,0	+ 14,2
4	Magencarcinom, etwa 40 bis 70 % Carcinomzellen; Zellgehalt an verschiedenen Stellen des Tumors sehr verschiedenartig	+ 10,5	+ 9,7	+ 13,2	+ 12,4	+ 24,2	+ 22,2
5	Magencarcinom, medullärer Tumor, fast 100 % Zellen, kleine Nekrosen	+ 19,6	+ 18,6	—	—	Serum A + 18,3 Serum B + 25,2	+ 17,6 + 23,6
6	Mammacarcinom, medul- lärer Tumor, zahlreiche ver- kalkte Stellen	+ 14,0	+ 12,5	+ 14,6	+ 12,5	—	—
7	Oberkiefercarcinom (Plattenepithel), fast 100 % Zellen, Nekrosen	+ 13,9	+ 13,4	—	—	Serum A + 15,5 Serum B + 13,6	+ 11,4 + 8,9
8	Mammacarcinom, etwa 50 bis 80 % Zellen **	+ 20,2	+ 18,7	+ 19,6	+ 18,4	+ 15,4	+ 14,3
9	Myxosarkom, zahlreiche Schleimzellen in manchen Teilen des Tumors	+ 19,1	+ 17,0	+ 9,7	+ 8,4	Serum A + 16,8 Serum B + 16,9	+ 14,0 + 14,1
10	Rectumcarcinom, etwa 50 bis 80 % Krebszellen	+ 14,2	+ 14,5	+ 19,7	+ 18,2	+ 16,9	+ 13,6
11	Mammacarcinom, einfaches medulläres Carcinom, Zell- gehalt in verschiedenen Par- tien sehr wechselnd, etwa 50 bis 90 %	+ 27,0	+ 23,1	+ 14,3	+ 12,9	+ 15,1	+ 13,1
12	Mammacarcinom, Scirrhus, etwa 20 % Krebszellen, im übrigen Bindegewebe	+ 9,8	—	+ 7,4	—	+ 8,2	—

* In den Fällen 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15 und 16 stammte das Carcinomserum von dem-
selben Kranken wie das Carcinom.

** Hierzu Protokoll 2 in Abschnitt III.

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr.	Material	$Q_M^{N_2}$ in Ringerlösung		$Q_M^{N_2}$ in Carcinomserum		$Q_M^{N_2}$ in Nicht- Carcinomserum	
		1. Stde.	2. Stde.	1. Stde.	2. Stde.	1. Stde.	2. Stde.
13	Magencarcinom, etwa 40 bis 60 % Krebszellen	+ 12,7	—	+ 11,4	—	+ 10,9	—
14	Mammacarcinom (gleicher Tumor wie Fall 1 der Tab. I)	—	—	+ 11,1	+ 10,4	+ 15,1	+ 15,1
15	Hautcarcinom (gleicher Tumor wie Fall 3 der Tab. I)	—	—	+ 13,3	+ 13,3	+ 14,0	+ 13,5
16	Lippencarcinom (gleicher Tumor wie Fall 4 der Tab. I)	—	—	+ 10,8	+ 10,3	+ 19,9	+ 19,6

Tabelle III.

Aerobe und anaerobe Gärung des Jensensarkoms in Ringerlösung und in verschiedenen Seren*.

Versuchsflüssigkeit:	Ringerlösung	Normales Rattenserum	Serum einer Ratte, bei der eine Impfung mit Jensensarkom erfolglos war	Serum einer Ratte mit Jensensarkom
$Q_M^{O_2}$	+ 21,5	+ 15,6	+ 17,0	+ 17,6
$Q_M^{N_2}$	+ 32,2	+ 29,6	+ 30,3	+ 30,6

* Hierzu Protokoll 3 in Abschnitt III.

Tabelle IV.

Stoffwechsel des Roussarkoms in Ringerlösung, normalem Hühnerserum und Serum eines Roussarkomhuhnes*.

Versuchsflüssigkeit:	Ringerlösung	Normales Hühnerserum	Serum desselben Roussarkomhuhnes, von dem das Tumormaterial stammt
Q_{O_2}	— 6,2	— 4,8	— 6,0
$Q_M^{O_2}$	+ 11,0	+ 11,3	+ 11,4
$Q_M^{N_2}$	+ 16,0	+ 21,8	+ 19,6

* Hierzu Protokoll 4 in Abschnitt III.

moren und bezieht man die Stoffwechselquotienten anstatt auf das Gesamtgewebegewicht auf die Krebszellen, so ergeben die menschlichen Tumoren — mit einer Ausnahme — ebenso große U - und $Q_M^{N_2}$ -Werte wie die fast nur aus Krebszellen bestehenden transplantierten Tier-tumoren. Die einzige Ausnahme betrifft ein Sarkom der Schilddrüse (Tabelle I, Nr. 5), einen sehr weichen, zerfallenden Tumor mit ausgedehnten nekrotischen Partien, dessen Stoffwechsel dem Typus der gutartigen Tumoren entspricht.

III. Protokolle.

1. Stoffwechsel eines menschlichen Lippencarcinoms in Carcinomserum und Normalserum.

Plattenepithelcarcinom, etwa 50 bis 70 % Krebszellen enthaltend.
Temperatur 37,5°.

	Gefäß A. ° Carcinomserum (von dem gleichen Kranken, von dem das Lippencarcinom stammt)	Gefäß B. ° Normales menschliches Serum
Versuchsflüssigkeit	2,6 · 10 ⁻² mol. 0,2 % $v_F = 7$ $v_G = 6,56$	2,4 · 10 ⁻² mol. 0,2 % $v_F = 7$ $v_G = 6,76$
Bicarbonatkonzentration . . .		
Glucosekonzentration		
Volumina ccm	$K_{O_2} = 0,594$ $K_{CO_2}^{Ringer} = 0,955$	$K_{O_2} = 0,611$ $K_{CO_2}^{Ringer} = 0,972$
Gefäßkonst. in Ringerlös. qmm	0,110	0,125
$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M$		
Gefäßkonst. in Serum . qmm	$K_M^{Serum} = 1,725$	$K_M^{Serum} = 1,847$
Schnittgewichte	9,91 mg	9,85 mg
Gasraum	5 % CO ₂ in O ₂	5 % CO ₂ in O ₂
Druckänderungen in 15'	+ 4 mm	+ 3 mm
" " 15	+ 3,5 "	+ 2,5 "
Aus jedem Versuchsgefäß werden 4 ccm Serum herauspipettiert.		
Gefäßkonst. in Ringerlös. qmm	$k_{O_2} = 0,936$ $k_{CO_2}^{Ringer} = 1,091$	$k_{O_2} = 0,953$ $k_{CO_2}^{Ringer} = 1,108$
$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M$	0,130	0,149
Gefäßkonst. in Serum . qmm	$k_M = 1,481$	$k_M = 1,555$
Gasraum	5 % CO ₂ in O ₂	5 % CO ₂ in O ₂
Druckänderungen in 10'	+ 7,5 mm	+ 7,5 mm
" " 10	+ 8,5 "	+ 8 "
Der Sauerstoff in den Versuchsgefäßen wird durch Stickstoff ersetzt.		
Gasraum	5 % CO ₂ in N ₂	5 % CO ₂ in N ₂
Druckänderungen in 10'	+ 18,5 mm	+ 17,5 mm
" " 10	+ 18 "	+ 16,5 "
Stoffwechselquotienten		
Q_{O_2}	— 3,4	— 3,8
$Q_M^{O_2}$	+ 9,2	+ 9,7
$Q_M^{N_2}$	+ 16,3	+ 16,1
$\frac{Q_M^{N_2} - Q_M^{O_2}}{Q_{O_2}}$ (Meyerhof-quotient)	2,2	1,7
U	+ 9,5	+ 8,5
$\frac{U}{Q_M^{N_2}}$	58 %	53 %

* Form der Gefäße s. diese Zeitschr. 152, 57, 1927.

2. Anaerobe Gärung eines menschlichen Mammacarcinoms in Ringerlösung, Normalserum und Carcinomserum.

Einfaches medulläres Carcinom mit etwa 50 bis 80% Krebszellen (Fall 8 der Tabelle II). Temperatur 37,5°.

Versuchsflüssigkeit	Gefäß A. Ringerlösung	Gefäß B. Normalserum	Gefäß C. Serum der Kranken, von der das Carci- nom stammte
Bicarbonatkonzentration der Versuchsflüssigkeit	2,5 · 10 ⁻² mol.	2,3 · 10 ⁻² mol.	2,7 · 10 ⁻² mol.
Glucosekonzentration der Versuchsflüssigkeit	0,20%	0,20%	0,20%
Volumina ccm	$v_F = 3$ $v_G = 10,98$	$v_F = 3$ $v_G = 10,44$	$v_F = 2$ $v_G = 11,76$
Gefäßkonst. i. Ringerlös., qmm	$k_{CO_2}^{Ringer} = 1,128$	$k_{CO_2}^{Ringer} = 1,081$	$k_{CO_2}^{Ringer} = 1,144$
$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M$	—	0,153	0,266
Gefäßkonst. in Serum, qmm	—	$k_M = 1,540$	$k_M = 1,676$
Schnittgewichte	6,40 mg	7,45 mg	6,71 mg
Gasraum	5 % CO ₂ in N ₂	5 % CO ₂ in N ₂	5 % CO ₂ in N ₂
Druckänderungen in 20'	+ 39 mm	+ 25 mm	+ 26,5 mm
" " 20	+ 38,5 "	+ 25 "	+ 26 "
" " 20	+ 37 "	+ 24,5 "	+ 26 "
" " 20	+ 36 "	+ 23 "	+ 24,5 "
" " 20	+ 35,5 "	+ 23,5 "	+ 25 "
" " 20	+ 34,5 "	+ 23 "	+ 24 "
$Q_M^{N_2}$ erste Stunde . . .	+ 20,2	+ 15,4	+ 19,6
" zweite " . . .	+ 18,7	+ 14,8	+ 18,4

3. Gärung des Jensensarkoms in Ringerlösung und verschiedenen Seren.

Die Gewebeschnitte wurden in Serum von Tumorratten hergestellt. Bicarbonatkonzentration der Ringerlösung und der Seren: 2,5 · 10⁻² mol.

Glucosekonzentration der Ringerlösung und der Seren 0,2%.

Temperatur 37,6°.

Versuchsflüssigkeit . .	Gefäß A. Ringerlösung	Gefäß B. Serum einer nor- malen Ratte	Gefäß C. Serum ein. Ratte, bei der eine Imp- fung mit Jensens- sarkom erfolglos geblieben war	Gefäß D. Serum ein. Ratte mit einem Jensenssarkom
Volumina ccm	$v_F = 2$ $v_G = 11,32$	$v_F = 2$ $v_G = 10,77$	$v_F = 1,3$ $v_G = 12,43$	$v_F = 2$ $v_G = 11,58$
$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)$	—	0,185	0,169	0,0835
Gefäßkonstanten, qmm	$k_{CO_2}^{Ringer} = 1,103$ —	$k_{CO_2}^{Ringer} = 1,054$ $k_M^{Serum} = 1,424$	$k_{CO_2}^{Ringer} = 1,164$ $k_M^{Serum} = 1,384$	$k_{CO_2}^{Ringer} = 1,127$ $k_M^{Serum} = 1,294$
Schnittgewichte . . .	3,90 mg	5,48 mg	5,61 mg	5,66 mg
Gasraum	5 % CO ₂ in O ₂	5 % CO ₂ in O ₂	5 % CO ₂ in O ₂	5 % CO ₂ in O ₂
Druckänderungen in	mm	mm	mm	mm
10'	+ 12,5	+ 10,5	+ 11,5	+ 13
10	+ 12,5	+ 9,5	+ 11,5	+ 12,5
10	+ 13	+ 10	+ 11,5	+ 13

Protokoll 3 (Fortsetzung).

Gasraum	Der Sauerstoff wird durch Stickstoff ersetzt			
	5 0/0 CO ₂ in N ₂	5 0/0 CO ₂ in N ₂	5 0/0 CO ₂ in N ₂	5 0/0 CO ₂ in N ₂
Druckänderungen in	mm	mm	mm	mm
10'	+ 19	+ 20	+ 21,5	+ 22,5
10	+ 19	+ 18	+ 19,5	+ 22
$Q_M^{O_2}$ *	+ 21,5	+ 15,6	+ 17,0	+ 17,6
$Q_M^{N_2}$	+ 32,2	+ 29,6	+ 30,3	+ 30,6

* $Q_M^{O_2}$ wurde erhalten, indem die Druckänderung in Sauerstoff pro Milligramm und Stunde mit k_{CO_2} bzw. k_M multipliziert wurde. Vgl. hierzu O. Warburg, diese Zeitschr. 172, 440, 1926.

4. Stoffwechsel des Roussarkoms in Ringerlösung, in Serum eines normalen Huhnes und in Serum eines Roussarkomhuhnes*.

Temperatur 37,5°.

	Gefäß A. ** Ringerlösung	Gefäß B. ** Normales Hühnerserum	Gefäß C. ** Serum eines Roussarkomhuhnes ***
Versuchsflüssigkeit			
Bicarbonatkonzentration der Versuchsflüssigkeit	2,5 · 10 ⁻² mol.	2,4 · 10 ⁻² mol.	2,25 · 10 ⁻² mol.
Glucosekonzentration der Versuchsflüssigkeit	0,20 0/0	0,23 0/0	0,26 0/0
Volumina ccm	$v_F = 7$ $v_G = 6,44$	$v_F = 7$ $v_G = 6,71$	$v_F = 7$ $v_G = 6,56$
Gefäßkonst. i. Ringerlös., qmm	$K_{O_2} = 0,583$ $K_{CO_2}^{Ringer} = 0,945$	$K_{O_2} = 0,608$ $K_{CO_2}^{Ringer} = 0,969$	$K_{O_2} = 0,594$ $K_{CO_2}^{Ringer} = 0,955$
$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M$	—	0,070	0,090
Gefäßkonst. in Serum . qmm	—	$K_M = 1,459$	$K_M = 1,585$
Schnittgewichte	4,94 mg	4,39 mg	5,32 mg
Gasraum	5 0/0 CO ₂ in O ₂	5 0/0 CO ₂ in O ₂	5 0/0 CO ₂ in O ₂
Druckänderungen in 30'	+ 19 mm	+ 7 mm	+ 2 mm
Aus jedem Versuchsgefäß werden 4 ccm Versuchsflüssigkeit herauspipettiert.			
Gefäßkonst. i. Ringerlös., qmm	$k_{O_2} = 0,926$ $k_{CO_2}^{Ringer} = 1,081$	$k_{O_2} = 0,950$ $k_{CO_2}^{Ringer} = 1,105$	$k_{O_2} = 0,936$ $k_{CO_2}^{Ringer} = 1,091$
$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M$	—	0,084	0,108
Gefäßkonst. in Serum . qmm	—	$k_M = 1,357$	$k_M = 1,415$
Gasraum	5 0/0 CO ₂ in O ₂	5 0/0 CO ₂ in O ₂	5 0/0 CO ₂ in O ₂
Druckänderungen in 30'	+ 23 mm	+ 15 mm	+ 15,5 mm

* Die Gewebeschnitte wurden im Serum eines Roussarkomhuhnes angefertigt.

** Form: siehe diese Zeitschr. 152, 57, 1924.

*** Das Serum stammte von dem gleichen Tiere, von dem das für den Versuch verwendete Roussarkom stammte.

Protokoll 4 (Fortsetzung).

Gasraum	Der Sauerstoff in den Versuchsgefäßen wird durch Stickstoff ersetzt		
	5 % CO ₂ in N ₂	5 % CO ₂ in N ₂	5 % CO ₂ in N ₂
Druckänderungen in 20'	+ 24 mm	+ 23,5 mm	+ 24,5 mm
Stoffwechselquotienten			
Q_{O_2}	— 6,2	— 4,8	— 6,0
$Q_M^{O_2}$	+ 11,0	+ 11,3	+ 11,4
$Q_M^{N_2}$	+ 16,0	+ 21,8	+ 19,6
U	+ 3,6	+ 12,2	+ 7,6
U	22 %	56 %	39 %
$Q_M^{N_2}$			

Über Galaktoaraban der Lupinensamen.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

A. Heiduschka und H. Tettenborn.

(Aus dem Laboratorium für Lebensmittel- und Gärungschemie der Sächs. Technischen Hochschule.)

(Eingegangen am 3. August 1927.)

Den Lupinensamen fehlt die Stärke fast ganz, da sie nur in unreifen Samen, und auch da nur in äußerst geringen Mengen vorkommt. Im wesentlichen enthalten sie zwei Kohlehydrate, von denen das eine, die Lupeose, in Wasser löslich, das andere, das sogenannte Galaktoaraban, unlöslich ist.

Das Galaktoaraban steht seinem chemischen Verhalten nach zweifellos der Stärke nahe, und es war von Interesse, unsere Kenntnisse gerade über dieses Kohlehydrat tunlichst zu erweitern. Zum ersten Male berichten über Galaktoaraban *E. Schulze*, *Steiger* und *Maxwell*¹, die feststellten, daß beim Kochen der fein pulverisierten Lupinensamen mit verdünnter Schwefelsäure oder Salzsäure eine zuckerhaltige, *Fehlingsche* Lösung reduzierende Flüssigkeit entsteht. Sie entfernten daraus die Eiweißstoffe und erhielten beim Eindampfen der Lösung einen Sirup, aus dem sich nach längerem Stehen Kristalle abschieden. Diese erwiesen sich auf Grund ihrer spezifischen Drehung und ihres Oxydationsproduktes, der Schleimsäure, als Galaktose. Im Laufe ihrer weiteren Untersuchungen trennten sie die gepulverten Lupinensamen in einen löslichen Teil und einen unlöslichen Rückstand, den sie als para-galaktanhaltigen Rückstand bezeichneten und in dem sie Pentosen nachwiesen; und zwar glaubten sie, daß Arabinose vorliege, und daher bezeichneten sie von da an das Kohlehydrat als Galaktoaraban.

¹ *E. Schulze*, *E. Steiger* und *W. Maxwell*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 14, 227, 1890.

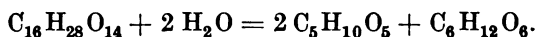
Beim Betrachten der Ergebnisse der Arbeiten von *E. Schulze*¹ und seinen Mitarbeitern drängen sich ohne weiteres Bedenken auf, die von den genannten Autoren schon selbst geäußert worden sind.

Ehe irgendwelche Schlüsse über die Zusammensetzung dieses vermutlichen Kohlehydrats geäußert werden können, ist zunächst erforderlich, es zu isolieren. Dazu eignete sich die schon von *Schulze* und *Steiger* selbst angegebene Kaliumverbindung, die allerdings von diesen Autoren als Zersetzungsprodukt des vermuteten Galaktoarabans aufgefaßt wurde.

Wir haben zunächst die Kaliumverbindung auf verschiedene Weise durch Behandeln des Lupinensamens mit verdünnter KOH erhalten. Jedesmal entstand sofort eine wesentliche Menge des gleichen Produkts mit den gleichen optischen Eigenschaften, und wir glauben mit Recht annehmen zu können, daß es sich nicht um ein Abbauprodukt handelt, sondern um das ursprünglich in den Lupinen vorhandene Kohlehydrat.

Aus der Kaliumverbindung wurde das freie Galaktoaraban hergestellt und daraus durch Kochen mit Salzsäure Pentose abgespalten.

Mit CuSO_4 gab Galaktoaraban eine gut charakterisierbare Additionsverbindung, ähnlich wie sie *Salkowski*² bei Xylan erhalten hat. Gleichartige Verbindungen wurden mit Bleinitrat und Zinksulfat erhalten. Leicht zersetzliche Verbindungen entstehen mit Silber- und Quecksilbersalzen. Auf Grund seines Verhaltens und der Elementaranalysen ist dem Galaktoaraban die Formel $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$ zuzuschreiben, entsprechend einem Trisaccharid aus zwei Molekülen einer Pentose und einem Molekül Galaktose:



Experimenteller Teil.

Zur Gewinnung des Galaktoarabans wurden die zerkleinerten Samen von der gelben Lupine (*Lupinus luteus*) im Soxhletapparat nacheinander mit Alkohol und Äther ausgezogen, der Rückstand zunächst mit kalter 0,2 %iger Natronlauge, zur Entfernung gewisser Eiweißstoffe, und dann mit heißer 2 %iger Kalilauge extrahiert. Um ein möglichst vollkommenes Lösen des Kohlehydrats zu erzielen, wurde dabei so verfahren, daß der nach der Behandlung verbleibende Rückstand portionsweise unter tüchtigem Umrühren bei kleiner Flamme

¹ a. a. O.

² Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**, 162, 1901/02; **35**, 240, 1902; **117**, 48, 1921.

in die heiße Kalilauge hineingegeben wurde. Das Filtrieren der alkalischen Flüssigkeit bot beträchtliche Schwierigkeiten, da sich sowohl Faltenfilter als auch glatte Filter auf der Nutsche sehr bald verstopften. Als bestes Filter erwies sich Nesseltuch, das auf die Nutsche gegeben und häufig ausgewaschen wurde. Beim Versetzen des Filtrats mit Alkohol fiel die Kaliumverbindung gallertartig bis schleimig aus und ließ sich ebenfalls nur schwer abfiltrieren. Dabei zeigte sich, daß der Niederschlag verschieden ausfiel, je nachdem ob die Fällung in der Wärme oder in der Kälte ausgeführt wurde. In der Kälte fiel die Substanz als steife Gallerte aus. War die Lösung jedoch warm, so wurde sie auf Zusatz des Alkohols dickflüssig, ohne daß eine eigentliche Fällung eintrat. Auch die Konzentrationsverhältnisse spielen eine große Rolle dabei. War nämlich die Lösung des Kaliumgalaktoarabans sehr verdünnt, so entstand auch bei starker Abkühlung kein Niederschlag. Am besten gelang die Fällung, wenn die abgekühlte Lösung in den Alkohol, nicht umgekehrt, gegeben wurde. Das so gewonnene Produkt enthielt noch etwa 1 % Eiweiß. Zur weiteren Reinigung wurde es wieder in Wasser gelöst, zum Sieden erhitzt (zur Koagulation der Eiweißstoffe), stark verdünnt, durch ein Faltenfilter heiß filtriert und nach dem Einengen wieder mit Alkohol gefällt. Nach dreimaligem Lösen und Fällen zeigte das Kaliumgalaktoaraban keine Biuretreaktion mehr, es war also eiweißfrei.

Zur Gewinnung des freien Galaktoarabans wurde die Substanz in Wasser gelöst und in etwa n-Essigsäure gegossen. Erst nach Auswaschen mit Alkohol, Trocknen im Vakuumexsikkator, Zerreiben und wieder Aufschwemmen im Wasser konnte das Galaktoaraban säurefrei erhalten werden.

Das Kaliumgalaktoaraban ist in trockenem Zustande eine schwach gelbliche, faserige, leicht zerreibliche Substanz, löslich in kaltem, leicht löslich in heißem Wasser. Die wässrige Lösung reagiert gegen Lackmus neutral.

Als wichtigstes erschien zunächst, festzustellen, ob man allgemein bei der Behandlung der Lupinensamen mit Kalilauge immer zu der gleichen Verbindung gelangt. Zu diesem Zwecke wurden mehrere Präparate dargestellt, zum Teil nach verschiedenen Methoden. Präparat I wurde gewonnen, wie oben angegeben, ohne vorherige Behandlung der Samen mit Kochsalzlösung. Die Einwirkung der heißen 2 %igen Kalilauge betrug eine halbe Stunde.

Präparat II wurde in gleicher Weise gewonnen. Einwirkung der Kalilauge $1\frac{1}{2}$ Stunden.

Präparat III. Die Samen wurden vorher mit 10 %iger Kochsalzlösung behandelt. Einwirkung der Kalilauge 1 Stunde.

Die Substanzen wurden so lange umgelöst und wieder gefällt, bis sie keine alkalische und keine Biuretreaktion mehr zeigten. Dann wurde das spezifische Drehungsvermögen bestimmt.

Präparat I:	1. $[\alpha]_D^{30} = + 78,81^\circ$.	2. $[\alpha]_D^{30} = + 77,99^\circ$.
„ II:	1. $[\alpha]_D^{30} = + 75,15^\circ$.	2. $[\alpha]_D^{30} = + 76,43^\circ$.
„ III:	1. $[\alpha]_D^{30} = + 76,98^\circ$.	

Die Differenz der gefundenen Werte für das spezifische Drehungsvermögen der drei Präparate beträgt im höchsten Falle $3,66^\circ$ und liegt innerhalb der Fehlergrenze. Man kann also aus den Werten schließen, daß man bei der Gewinnung der Kalium-Galaktoarabanverbindung immer zu einer gleichen Substanz gelangt.

Das Kaliumgalaktoaraban ist in organischen Lösungsmitteln unlöslich. Alkohol, Äther, Chloroform, Aceton fallen es aus seiner Lösung aus, wobei das mit Wasser nicht mischbare Fällungsmittel lange Zeit emulgiert bleibt. Die wässrige Lösung wird durch Magnesiumsulfat, Ammoniumsulfat und Kochsalz ausgesalzen und durch Phosphorwolframsäure ausgefällt.

Analyse: 1,1669 g Substanz gaben 0,2022 g K_2SO_4 .

$C_{18}H_{28}O_{14} \cdot KOH$ ¹: Ber.: 7,80 % K;

Gef.: 7,78 % K.

Versetzt man eine Lösung des Kaliumgalaktoarabans mit einer verdünnten Lösung eines Schwermetallsalzes, so entsteht eine Fällung. Kupfersulfat erzeugt einen blauen, Bleinitrat und Zinksulfat einen weißen Niederschlag, die alle sehr beständig sind. Die Fällung, die durch Silbernitrat hervorgerufen wird, zersetzt sich jedoch sehr rasch unter Abscheidung von Silber. Calcium- und Magnesiumsalze erzeugen nur in konzentrierten Lösungen Niederschläge. Um nun festzustellen, ob diese Fällungen von konstanter Zusammensetzung sind, wurde die Kupferverbindung unter verschiedenen Bedingungen dargestellt und in den dabei gewonnenen Niederschlägen das Kupfer bestimmt.

Je 20 ccm einer Lösung, die in 500 ccm 7,5 g der Kaliumverbindung enthielt, wurden mit je 30 ccm einer $n/2$, $n/4$, $n/8$ und $n/16$ Kupfersulfatlösung versetzt. Da, wie oben schon erwähnt, die Konzentrationsverhältnisse eine Rolle bei den Fällungen spielen, wurde bei der einen Versuchsreihe die Kupfersulfatlösung, bei der anderen die Lösung der Kaliumverbindung vorgelegt. Die entstandenen Niederschläge wurden abfiltriert und so lange gewaschen, bis in dem Waschwasser weder mit Ammonsulfid noch mit Ammoniak Kupfer nachzuweisen war.

¹ Koch, B. 20, 145, 1887; Prinson-Geerligs Chem.-Ztg. 21, 150, 1897.

1. Die Galaktoarabanlösung wurde zur CuSO_4 -Lösung gegeben		2. Die CuSO_4 -Lösung wurde zur Galaktoarabanlösung gegeben	
CuSO_4 -Lösung	CuO g	CuSO_4 -Lösung	CuO g
n/2	0,0480	n/2	0,0470
n/4	0,0470	n/4	0,0480
n/8	0,0470	n/8	0,0470
n/16	0,0475	n/16	0,0470

Aus den vorstehenden Ergebnissen geht hervor, daß nicht nur bei den verschiedenen Darstellungsweisen immer dieselbe Menge Cu-Verbindung entsteht, sondern auch, daß sie immer denselben Cu-Gehalt hat, also auch eine konstante Zusammensetzung besitzen muß.

Bei der vollständigen Analyse der Verbindung, deren qualitative Analyse noch das Vorhandensein von Schwefelsäure ergab, resultierten folgende Werte:

5,259 mg Substanz gaben 6,087 mg CO_2 und 2,080 mg H_2O
 0,2746 g „ „ (elektrolytisch) 0,0287 g Cu
 0,2542 g „ „ 0,0975 g BaSO_4

Gefunden %	Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_{14}\text{CuSO}_4$ %
C = 31,51	C = 31,79
H = 4,43	H = 4,63
Cu = 10,45	Cu = 10,60
SO_4 = 15,72	SO_4 = 15,90

Analyse des Galaktoarabans.

0,2247 g Substanz gaben 0,3543 g CO_2 und 0,1287 g H_2O .

Gefunden %	Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_{14}\text{CuSO}_4$ %
C = 42,99	C = 43,24
H = 6,41	H = 6,31

Beim Kochen des Galaktoarabans mit 12 %iger Salzsäure während 3 Stunden wurde ein Destillat erhalten, in dem einwandfrei durch die Phloroglucinprobe Furfurol in beträchtlichen Mengen festgestellt wurde, wodurch das Vorhandensein von Pentosen auch in dem isolierten Kohlehydrat erwiesen war.

Synthese der durch Hydrolyse des Roh-Oryzanins entstehenden β -Säure (2,6-Dioxychinolin-4-carbonsäure).

Von

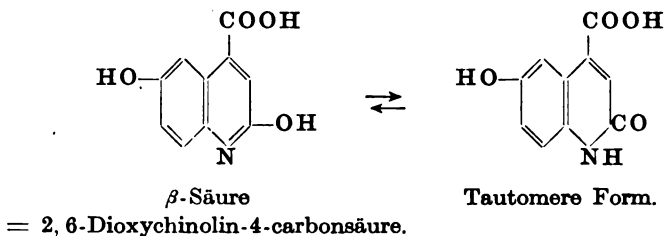
Yoshikazu Sahashi.

(Mitgeteilt von Prof. U. Suzuki aus dem Biochemical Laboratory, Institute of Physical and Chemical Research Tokyo, Japan.)

(Eingegangen am 4. August 1927.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

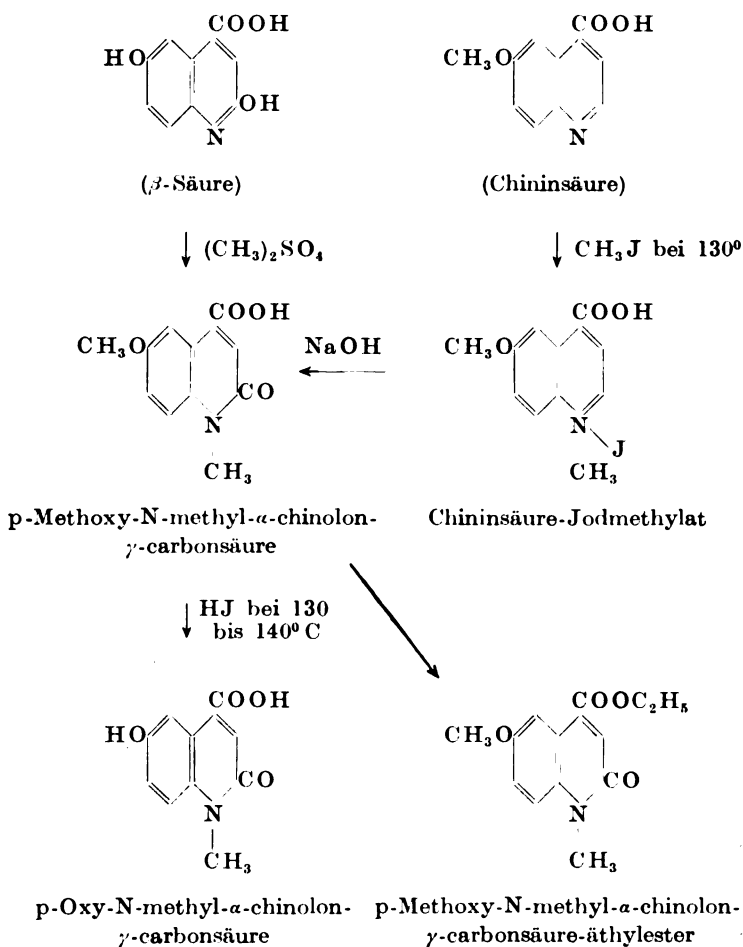
In seiner letzten Mitteilung¹ äußerte der Verfasser auf Grund seiner Abbauprobversuche die Ansicht, daß der β -Säure höchstwahrscheinlich folgende Formel zuzuschreiben ist:

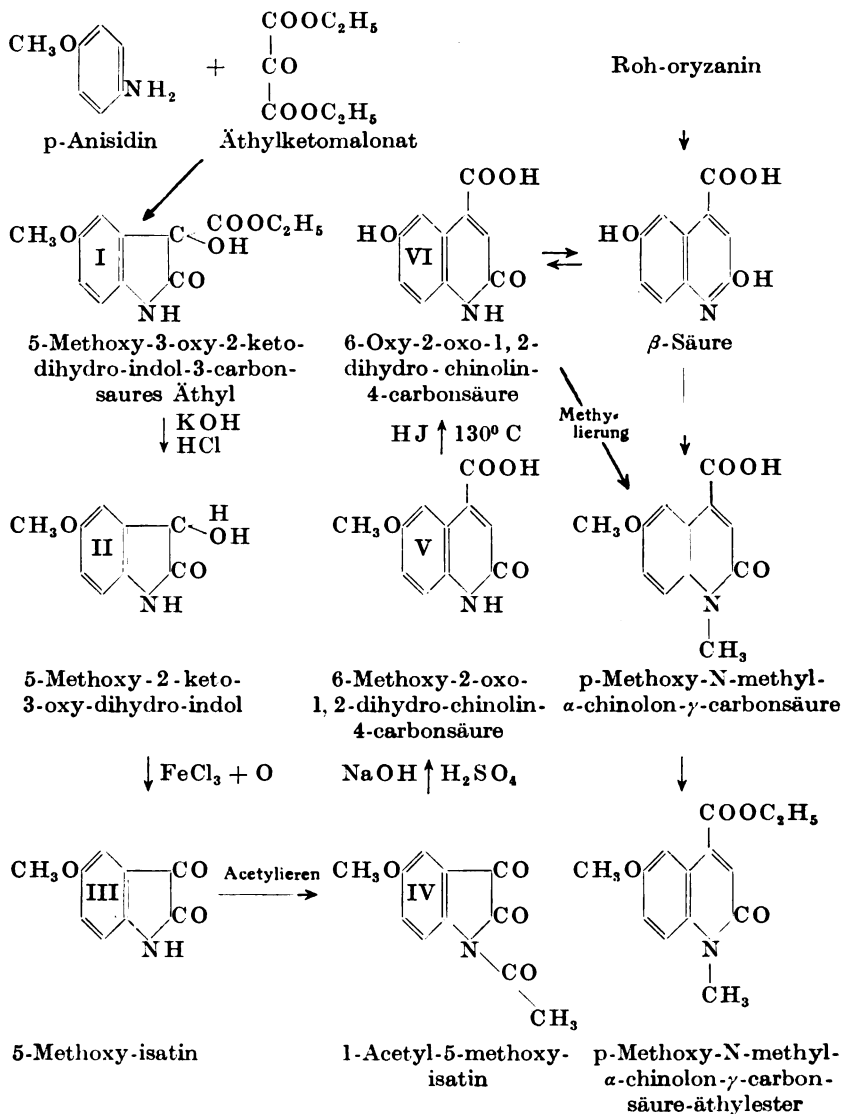


Diese Annahme wurde in der Folge durch die Synthese der Roserschen p-Methoxy-N-methyl- α -chinolin- γ -carbonsäure bestätigt. Die synthetische Säure wies nämlich mit dem Dimethylderivat der β -Säure, das durch Einwirkung von Dimethylsulfat auf dieselbe erhalten worden war, vollkommene Übereinstimmung auf.

¹ Diese Zeitschr. 159, 221, 1925; 168, 69, 1926.

Somit war nur noch die Synthese der freien β -Säure zu bewerkstelligen. Im Jahre 1921 stellte *J. Halberkann* aus p-Anisidin und Äthylketomalonat die 6-Methoxy-2-oxo-1, 2-dihydrochinolin-4-carbonsäure dar. Der Verfasser machte nun darauf aufmerksam, daß diese Säure mit dem 6-Methoxy-derivat der β -Säure identisch sein dürfte. Daher wurde die 6-Methoxy-2-oxo-1, 2-dihydrochinolin-4-carbonsäure nach der Methode von *Halberkann* bereitet und mit Hilfe der *Zeiselschen* Reaktion in die 6-Oxy-2-oxo-1, 2-dihydrochinolin-4-carbonsäure übergeführt. Auf diese Weise wurde die völlige Identität der letztgenannten Säure mit der aus dem Roh-oryzanin erhaltenen β -Säure erwiesen und zugleich die Konstitution der β -Säure endgültig aufgeklärt.





Experimenteller Teil.

1. p-Methoxy-N-methyl- α -chinolon- γ -carbonsäure aus Chininsäure.

Zunächst wurde die Chininsäure (Schmelzpunkt 280°) nach Skraup¹ aus Chininsulfat (Japanische Pharmacopea) dargestellt und diese

¹ Skraup, M. 2, 589.

sodann nach *Claus* und *Stöhr*¹ in Chininsäure-jodmethylat (Schmelzpunkt 207 bis 208°) übergeführt. Wurde letzteres nach *Roser*² in kon-



Abb. 1.
Natürl. β -Säure, $C_{10}H_7NO_4$
(1 : 47).



Abb. 2.
Natürliche β -Säure,
 $C_{10}H_7NO_4 \cdot H_2O$ (1 : 110).



Abb. 3.
p-Methoxy-N-methyl-
 α -chinolon- γ -carbonsäure
aus natürlicher β -Säure
(1 : 47).



Abb. 4.
Synthetische β -Säure,
 $C_{10}H_7NO_4$ (1 : 40).

zentrierter Natronlauge gelöst, so schied sich die p-Methoxy-methylchinolon-carbonsäure neben der p-Methoxy-methyl-dihydrochinolin-

¹ *Claus* und *Stöhr*, A. 276, 268.

² *Roser*, A. 282, 367.

carbonsäure in Gestalt gelber Nadeln aus. Die Substanz gab keine Ferriferrieyanidreaktion und war mit dem Dimethylderivat der β -Säure



Abb. 5.
Synthetische β -Säure,
 $C_{10}H_7NO_4 \cdot H_2O$ (1:120).



Abb. 6.
p-Methoxy-N-methyl- α -chinolon- γ -carbonsäure
aus Chininsäure (1:47).

vollkommen identisch; sie wurde bei 120 bis 130° getrocknet und analysiert:

0,1068 g Substanz	0,2427 g CO_2 , 0,0450 g H_2O
6,58 mg „	0,370 ccm N (15°, 756,25 mm)
6,11 „ „	0,339 „ N (15°, 755,25 „)
6,48 „ „	0,333 „ N (14°, 771,00 „)
0,2255 g „	0,2250 g Ag J

	C %	H %	N %	$-OCH_3$ %	$-CH_3$ %
$C_{10}H_6NO_4(CH_3)_4$, gef. .	61,98	4,68	6,52 6,43	13,17	6,37
„ ber. .	61,80	4,72	6,01	13,30	6,44

Die Substanz schmilzt im Kapillarrohr gegen 295° (unkorrigiert) unter Zersetzung, also etwas niedriger als die Dimethyl- β -Säure. Eine Mischprobe mit Dimethyl- β -Säure zeigte jedoch keine Schmelzpunkts-erniedrigung.

2. p-Oxy-N-methyl- α -chinolon- γ -carbonsäure aus Chininsäure.

Die aus Chininsäure dargestellte p-Methoxy-N-methyl- α -chinolon- γ -carbonsäure wurde nach Zeisel mit konzentrierter Jodwasserstoffsäure erhitzt, um eine $-OCH_3$ -Gruppe abzuspalten. Nach dem Erkalten der Flüssigkeit schied sich die p-Oxy-N-methyl- α -chinolon- γ -carbonsäure kristallinisch aus. Mit der aus Dimethyl- β -Säure auf dieselbe Weise gewonnenen Substanz ergab sich vollständige Identität. Die Ferri-

ferricyanidreaktion ist positiv. Im Kapillarrohr schmelzen beide Säuren bei 304 bis 310° (unkorrigiert). Eine Mischprobe beider Präparate zeigte keine Depression.

Die Substanz wurde bei 120 bis 130° getrocknet und analysiert.

0,0729 g Substanz 0,1602 g CO₂, 0,0280 g H₂O
5,88 mg „ 0,308 ccm N (15°, 757,3 mm)

	C %	H %	N %
C ₁₀ H ₅ O ₃ N(CH ₃)OH, gef.	59,93	4,27	6,09
„ ber.	60,27	4,11	6,39

Äthylester der *p*-Methoxy-*N*-methyl-*α*-chinolon-*γ*-carbonsäure aus *β*-Säure bzw. aus Chininsäure.

Die aus der Chininsäure dargestellte *p*-Methoxy-*N*-methyl-*α*-chinolon-*γ*-carbonsäure wurde in wasserfreiem Alkohol suspendiert und trockenes Salzsäuregas bis zur vollständigen Lösung der Kristalle eingeleitet. Beim Verdampfen des Alkohols im Vakuum schied sich der Äthylester in hellgelben Nadeln aus, die sich in absolutem Alkohol mit grüner Fluoreszenz lösten. Das gereinigte Präparat wurde über Natronkalk im Vakuumexsikkator getrocknet. Es schmolz bei 166 bis 167° (unkorrigiert). Der aus der Dimethyl-*β*-Säure in analoger Weise dargestellte Äthylester wies ebenfalls genau denselben Schmelzpunkt auf, die Mischprobe zeigte keine Schmelzpunktserniedrigung.

Analyse des Äthylesters.

1. Dargestellt aus der Dimethyl-*β*-Säure:

0,0712 g Substanz 0,1654 g CO₂, 0,0374 g H₂O
6,98 mg „ 0,317 ccm N (15°, 766,5 mm)

	C %	H %	N %
C ₁₄ H ₁₆ NO ₄ , gef.	63,36	5,84	5,34
„ ber.	64,37	5,75	5,36

2. Dargestellt aus Chininsäure:

0,0745 g Substanz 0,1748 g CO₂, 0,0393 g H₂O
7,07 mg „ 0,344 ccm N (15°, 770,5 mm)
6,61 „ „ 0,325 „ N (15°, 756 „)

	C %	H %	N %
C ₁₄ H ₁₆ NO ₄ , gef.	63,99	5,86	5,75
„ ber.	64,37	5,75	5,36

Die Analysen der beiden Äthylester stimmten also vollkommen überein.

6-Methoxy-2-oxo-1, 2-dihydrochinolin-4-carbonsäure (V).

Die in diesem Versuch verwendete 6-Methoxy-2-oxo-1, 2-dihydrochinolin-4-carbonsäure wurde nach J. Halberkann¹ aus p-Anisidin und Äthylketomalonat (*Kahlbaum*) hergestellt. Zu diesem Zwecke wurde zuerst der 5-Methoxy-3-oxy-2-keto-dihydro-indol-3-carbonsäure-äthylester (I) vom Schmelzpunkt 193 bis 194° (unkorrigiert) dargestellt und durch sukzessive Behandlung mit n KOH und verdünnter Salzsäure in 5-Methoxy-2-keto-3-oxy-dihydro-indol (II) übergeführt. Bei weiterer Oxydation mit Ferrichlorid und Luftsauerstoff wurde 5-Methoxyisatin (III) vom Schmelzpunkt 195° (unkorrigiert) und durch Acetylieren des letzteren mit Essigsäureanhydrid das 1-Acetyl-5-methoxyisatin (IV) vom Schmelzpunkt 141 bis 142° (unkorrigiert) erhalten. Dieses wurde alsdann in 6-Methoxy-2-oxo-1, 2-dihydrochinolin-4-carbonsäure (V) übergeführt. Beim Erhitzen dieser Substanz mit Zinkstaub wurde Chinolingeruch wahrgenommen, während das 1-Acetyl-5-methoxyisatin bei derselben Behandlung die Indolbase lieferte.

Die Methoxylbestimmung nach Zeisel gab folgendes Resultat (Jodwasserstoff spez. Gew. 1,7):

0,4874 g	Substanz	(im Luftbad bei 130° getrocknet).	0,5186 g	Ag J
0,2161 g	„	(„ „ „ 130° „)	0,2317 g	Ag J
0,3569 g	„	(„ „ „ 130° „)	0,3817 g	Ag J

Methoxyl.

$C_{11}H_9NO_4$. Ber.: 14,16

Gef.: 14,04 14,16 14,12

6-Oxy-2-oxo-1, 2-dihydrochinolin-4-carbonsäure (VI) (synthetische β -Säure).

Verdünnt man den Rückstand der Methoxylbestimmung von 6-Methoxy-2-oxo-1, 2-dihydrochinolin-4-carbonsäure mit Wasser, so scheidet sich ein amorpher gelber Niederschlag in reichlicher Menge aus. Dieser Niederschlag wurde nacheinander aus Alkohol, Natronlauge und Salzsäure umkristallisiert, und zwar genau ebenso wie bei der Reinigung der aus Roh-oryzanin erhaltenen β -Säure. Die synthetische β -Säure (6-Oxy-2-oxo-1, 2-dihydrochinolin-4-carbonsäure) gibt starke Diazo-, Ferriferrieyanid- sowie die Thalleiochinreaktion und schmilzt noch nicht bei über 310°. Behandelt man die synthetische Säure mit Natronlauge, Alkohol und Salzsäure, so erhält man gelbe Nadeln (Abb. 5), die 1 Mol. Kristallwasser enthalten, ebenso wie die natürliche β -Säure aus Roh-oryzanin.

¹ J. Halberkann, Ber. 54, 3079, 1921.

Kristallwasserbestimmung.

0,1033 g Substanz (im Vakuum bei Zimmertemperatur über Chlorkalcium getrocknet) verloren nach dem Trocknen im Luftbad bei 150° C 0,0084 g H₂O.

	Kristallwasser
C ₁₀ H ₇ NO ₄ · H ₂ O, gef.	8,13
„ ber.	8,07

Elementaranalyse.

0,0761 g (bei 150° getrocknet) gaben 0,1620 g CO₂, 0,0252 g H₂O
 12,25 mg („ 150° „ „) „ 0,725 ccm N (24° C, 761,5 mm)

	C %	H %	N %
C ₁₀ H ₇ NO ₄ , gef.	58,06	3,68	6,62
„ ber.	58,54	3,41	6,83

Beim Umkristallisieren der nadelförmigen Kristalle der synthetischen β -Säure aus heißem, absolutem Alkohol erhält man kristallwasserfreie Prismen (Abb. 4). Dieses Verhalten entspricht dem der natürlichen β -Säure aus Roh-oryzanin.

0,0566 g Substanz (im Vakuumexsikkator über CaCl₂ bei Zimmertemperatur getrocknet) verloren nach dem Trocknen im Luftbad bei 150° nur 0,0001 g an Gewicht. 14,37 mg Substanz (bei 150° getrocknet) gaben 0,850 ccm N (25° C, 753 mm).

	N %
C ₁₀ H ₇ NO ₄ , gef.	6,50
„ ber.	6,83

p-Methoxy-*N*-methyl- α -chinolon- γ -carbonsäure aus synthetischer β -Säure.

Da die synthetische β -Säure noch nicht bei über 310° C schmilzt, wurde sie in *p*-Methoxy-*N*-methyl- α -chinolon- γ -carbonsäure übergeführt, und zwar durch Methylierung mit Dimethylsulfat und Kalilauge. Diese Säure wurde dann weiter in den Äthylester verwandelt. Hinsichtlich des Schmelzpunkts und anderer Eigenschaften stimmte dieser Ester mit dem aus natürlicher β -Säure in analoger Weise bereiteten Ester vollkommen überein.

18,21 mg Substanz (bei 100° C getrocknet) gaben 0,883 ccm N (24° C, 757,5 mm).

	N %
C ₁₄ H ₁₅ NO ₄ , gef.	5,37
„ ber.	5,36

Über die biochemische Überführung von Oximino-brenztraubensäure in Alanin.

Von

Kurt Maurer.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 4. August 1927.)

Die Untersuchungen über die phytochemische Reduktion¹ haben gelehrt, daß Substanzen aus vielen Gruppen, die einer Reduktion mit chemischen Methoden fähig sind, auch auf biochemischem Wege reduziert werden können. Die Umwandlungen von Aldehyden und Ketonen in primäre und sekundäre Alkohole, von Thioaldehyden und Disulfiden in Mercaptane, von Nitro- und Nitroso-körpern sowie substituierten Hydroxylaminen in Amine sind die bekanntesten Beispiele dieser Art. Interessanterweise haben neuere Untersuchungen von *H. Meerwein* und *R. Schmidt*² ergeben, daß diese phytochemische Reduktion in bemerkenswertem Umfange parallel geht mit der Reduktion der entsprechenden Verbindungen durch Aluminium- bzw. Magnesium-alkoholat. Ferner ist außer beim Phenylhydroxylamin auch die phytochemische Reduktion von Oximen gelungen, und zwar die des Chinon-monoxims und Chinondioxims, die *H. Lüers* und *J. Mengele*³ beschrieben haben.

Bisher nicht ausgeführt ist die biochemische Synthese einer Aminosäure nach dem Verfahren der phytochemischen Reduktion. Als Substrat wählte ich die *Isonitroso-brenztraubensäure*; diese Verbindung ist bereits auf rein chemischem Wege, nämlich durch Behandlung mit Zinn und Salzsäure, von *H. Gulke*⁴ zu Alanin reduziert worden, und es sei daran erinnert, daß die erste Totalsynthese des Lysins von *E. Fischer* und *F. Weigert*⁵ aus α -Oximino- δ -cyanvaleriansäure-äthylester durch Reduktion mit Alkohol und Natrium bewerkstelligt worden ist.

¹ Vgl. *C. Neuberg* und *G. Gorr*, *Phytochem. Reduktionen*; *Abderhaldens Handb. d. biolog. Arbeitsmethod.*, Abt. IV, S. 645, 1927.

² *A.* 444, 229, 1925.

³ *Diese Zeitschr.* 179, 238, 1926.

⁴ *B.* 13, 1118, 1880.

⁵ *B.* 85, 3772, 1902.

Tatsächlich gelingt die Reduktion des Brenztraubensäureoxims mit gärender Hefe. Die Einzelheiten der Aufarbeitung ergeben sich aus dem experimentellen Teil. Daß die gebildete Aminosäure nicht etwa durch Abbau von Hefenprotein entstanden, sondern aus dem Brenztraubensäurederivat hervorgegangen ist, folgt aus dem Umstande, daß das isolierte Alanin optisch inaktiv ist. Übrigens findet sich das Alanin im Hefeneiweiß nach den Untersuchungen von *C. Neuberg*¹ sowie von *J. Meisenheimer*² nur in sehr kleinen Mengen vor; auch waren die Arbeitsbedingungen derart, daß eine Abspaltung der Aminosäure aus dem Hefeneiweiß, wie die Kontrollversuche ausweisen, nicht in Betracht kommt.

Nach den bisherigen Erfahrungen kann sich eine natürliche Synthese von Alanin aus Brenztraubensäure auf dem Wege über die Iminosäure³ vollziehen. Die mitgeteilten Daten zeigen, daß auch die erste Oxydationsstufe der Iminosäure, die Oximinosäure, biologisch angreifbar ist.

Experimenteller Teil.

800 g Rohrzucker wurden in 3200 ccm Leitungswasser unter Erwärmen auf 40° gelöst und mit 800 g gut abgepreßter Unterhefe (*Schultheiss-Patzenhofer*) zur Angärung gebracht. Sobald die Kohlensäureentwicklung lebhaft geworden war, erfolgte mittels Tropftrichter der Zusatz einer Lösung von 20 g Brenztraubensäureoxim in 400 ccm Wasser. Die Oximinobrenztraubensäure wurde nach der Vorschrift von *V. Meyer* und *A. Janny*⁴ hergestellt. Die Zugabe der Lösung wurde so geregelt, daß die Gärung nie in Stillstand geriet. Zumeist nach 5 Stunden war das Eintropfen beendet; nach 60stündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur war keine Reduktion mit *Fehlingscher* Lösung mehr festzustellen, also der vorhandene Zucker verbraucht. Das Gärgut wurde hierauf durch Zentrifugieren vom Hefenschlamm befreit und in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade stark eingeeengt. Die hierbei sich abscheidenden Eiweißstoffe wurden wiederum abgeschleudert. Vom Zentrifugat, das ein Gesamtvolumen von 500 ccm besaß, wurden 250 ccm nach Ansäuern mit Schwefelsäure wiederholt mit viel Äther ausgeschüttelt, um etwa vorhandenes Oxim zurückzugewinnen. Nach dem Abdunsten des Äthers blieb kein Brenztraubensäureoxim zurück, ein Ergebnis, das auch bei verschiedenen Versuchen erzielt wurde. Die mit Lauge genau neutralisierten wässrigen

¹ Wochenschr. f. Brauerei **32**, 319, 1915.

² H. **104**, 229, 1919.

³ Vgl. hierzu *H. Wieland* und *F. Bergel*, A. **439**, 196, 1924; *F. Knoop* und *H. Oesterlin*, H. **148**, 294, 1925; *M. Bergmann* und *F. Stern*, A. **448**, 20, 1926.

⁴ B. **18**, 1527, 1882.

Lösungen wurden auf 200 ccm eingeeengt, zum Sieden erhitzt, mit dem gleichen Volumen heißen Alkohols versetzt und heiß zentrifugiert. Bei dieser Operation fällt etwa gebildetes Alanin nicht aus, wie durch Vorversuche sichergestellt war. Die im Vakuum zur Trockne eingedampfte klare Lösung hinterließ einen Sirup, der zweimal mit absolutem Alkohol in vacuo zur Trocknung eingedampft wurde.

Um das Alanin aus dem Substanzgemisch isolieren zu können, wurde zunächst der Sirup direkt der Benzoylierung, in einem zweiten Versuch der Behandlung mit α -Naphthylisocyanat unterworfen, doch konnte keine kristallisierte Substanz aus dem Gemisch der Reaktionsprodukte erhalten werden. Zum Ziel führte die Veresterungsmethode nach *Emil Fischer*. Der Sirup wurde in 200 ccm absoluten Alkohols gelöst, dann wurde ohne Kühlung ein kräftiger Strom getrockneten Salzsäuregases bis zur Sättigung eingeleitet. Hierbei ging der größte Teil des Sirups in Lösung; nach 4 Stunden wurde in vacuo eingedampft, mit 250 ccm absoluten Alkohols aufgenommen und wieder mit Salzsäure gesättigt. Nach abermaligem Eindampfen wurde der Rückstand in 60 ccm Wasser gelöst und nach Zugabe von 33 %iger Natronlauge sowie festem Kaliumcarbonat freier Aminosäureester durch Ausäthern gewonnen. Die Ätherlösung wurde 10 Minuten mit festem Kaliumcarbonat durchgeschüttelt und dann 12 Stunden über geglühtem Natriumsulfat belassen; dann wurde der Äther bei 35° vertrieben. Die stark konzentrierte Lösung wurde nunmehr der fraktionierten Destillation unter vermindertem Druck unterworfen und nachdem die Ätherreste entfernt waren, 7,6 g Sirup aufgefangen. Dieser Sirup wurde fraktioniert destilliert und eine Fraktion von 45° bis 75° bei $p = 14$ bis 18 mm aufgefangen (4,5 g); eine zweite Fraktion von 80 bis 110° bei $p = 15$ bis 20 mm ergab 1,6 g eines dickflüssigen Öles; der Rückstand im Kolben zersetzte sich. Fraktion I wurde mit 25 ccm Wasser am Rückflußkühler so lange gekocht, bis die alkalische Reaktion verschwunden war. In vacuo wurde bei 45° eingedampft und die abgeschiedene kristalline weiße Masse in wenig heißem Wasser gelöst. Nach Zusatz des doppelten Volumens an absolutem Alkohol und Aufbewahren im Eisschrank begann nach kurzer Zeit die Kristallisation der Aminosäure. Nach Absaugen und Trocknen hinterblieben 3 g weißer Kristalle, die bei 284° (unkorrigiert) unter Aufschäumen schmolzen. Ein Vergleichspräparat von d,l-Alanin zeigte denselben Schmelzpunkt, ebenso eine Mischschmelzprobe.

Zur weiteren Identifizierung wurden 0,9 g Substanz in 10 ccm Natronlauge gelöst, 2 g α -Naphthylisocyanat zugegeben und nach der Vorschrift von *C. Neuberg* und *A. Manasse*¹ verarbeitet. Das erhaltene

¹ B. 38, 2359, 1905.

α -Naphthylisocyanat-alanin zeigte nach zweimaligem Umkristallisieren den Schmelzpunkt 192° (unkorrigiert) unter Zersetzung. Ein zum Vergleich hergestelltes Präparat wies den gleichen Schmelzpunkt auf, ebenso die Mischschmelzprobe. Die wässrige Lösung der Substanz zeigte keinerlei Drehungsvermögen. Daß keine optische Aktivierung der Aminosäure eintrat, liegt wahrscheinlich daran, daß der hierfür nach *F. Ehrlich* notwendige große Zuckerüberschuß fehlte, vielleicht auch daran, daß der nach den Feststellungen¹ desselben Autors förderliche Biokatalysator nicht hinzugefügt worden war.

Kontrollversuch.

Um zu beweisen, daß das vorliegende Alanin nicht durch Autolyse der Hefe entstanden war, wurde gleichzeitig ein Kontrollversuch unter genau den gleichen Bedingungen wie im Hauptversuch, nur ohne Zugabe von Brenztraubensäureoxim angestellt und aufgearbeitet. Der resultierende Sirup wurde verestert und der Vakuumdestillation unterworfen, wobei nur eine Fraktion erhalten wurde, die der Fraktion II im Hauptversuch entsprach, nämlich 1,5 g bei 80 bis 110° , $p = 14$ bis 18 mm siedender Substanz. Dadurch ist der Beweis erbracht, daß bei 60stündiger Autolyse bei Zimmertemperatur keine niederen Aminosäuren auftreten, ein Resultat, das in voller Übereinstimmung mit den Angaben *J. Meisenheimers* steht; denn nach seinen Erfahrungen konnten aus 3850 g Hefe, die 26 Tage bei 37° der Autolyse unterworfen waren, nur $3,3$ g Alanin isoliert werden. Die Verseifung des hochsiedenden Ester-gemisches und Kristallisationsversuche mit dem Produkt der Hydrolyse führten zu keinem kristallisierten Körper.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danke ich ehrerbietigst für die zur Verfügung gestellten Mittel, mit denen vorliegende Untersuchung ausgeführt werden konnte.

¹ Diese Zeitschr. 182, 245, 1927.

Über eine Apparatur zur Messung und Beeinflussung des Gasstoffwechsels von Lebewesen und einige damit erhaltene Ergebnisse.

Von

W. Schoeller, M. Gehrke und S. Michael.

[Aus dem Hauptlaboratorium der Chemischen Fabrik auf Actien (vorm.
E. Schering). Mitteilung X.]

(Eingegangen am 6. August 1927.)

(Mit 2 Abbildungen im Text.)

I.

Die gebräuchlichen Apparaturen zur Messung des Gasstoffwechsels sind im allgemeinen recht unhandlich und nicht einfach zu bedienen. Darüber hinaus erfordern die Analysen der Gasgemische ziemlich viel Zeit und Arbeit. Änderungen in den Lebensbedingungen der Versuchsobjekte durch Variation der zur Atmung dienenden Atmosphäre sind gewöhnlich nicht möglich. Wir stießen auf dieses Problem durch die Mitteilung *O. Warburgs* (1), dem es gelang, durch Herabsetzung des Sauerstoffpartialdruckes der Atemluft den Stoffwechsel von Tumorzellen in vivo weitgehend zu beeinflussen. Dasselbe Problem wurde angeschnitten bei der Untersuchung des Stoffwechsels von Schimmelpilzen. Es bestand die Hoffnung, durch diese Methode auch bei anderen Zellarten eine Umstimmung des Stoffwechsels herbeiführen zu können und so interessante Einblicke in die Lebensverhältnisse bestimmter Zellarten oder Lebewesen zu erhalten. Zu diesem Zwecke benötigten wir eine einfache, leicht zu bedienende Apparatur, von der wir im folgenden einige Ausführungsformen beschreiben. Der Apparat ist zum Patent angemeldet.

II.

Das Prinzip ist im wesentlichen dadurch gegeben, daß bei konstantem Volumen der Apparatur die Atmungskohlensäure im Versuchsraum durch eines der üblichen Absorptionsmittel absorbiert wird, so daß für den verbrauchten Sauerstoff automatisch frischer nachströmt, wodurch für eine konstante Zusammensetzung der Versuchsatmosphäre

bei konstanter Temperatur unter normalem Atmosphärendruck Sorge getragen ist. Will man die Versuchsatmosphäre ändern, so verdrängt man die Luft aus der Apparatur durch ein anderes Gasgemisch und läßt dann Sauerstoff nachströmen, oder man läßt statt des Sauerstoffs ein anderes Gas oder Gasgemisch nachströmen, bis der gewünschte Änderungsgrad erreicht ist, alsdann wieder reinen Sauerstoff. Wenn man ferner für Ersatz des Kohlensäureabsorptionsmittels sorgt, läßt sich der Versuch beliebig lange ausdehnen.

III. Apparat für niedere Lebewesen.

Eine dreifach tubulierte Glasglocke wird durch Schrauben luftdicht auf eine ebene Messingplatte mit Gummiring gedrückt. In der Glocke befindet sich der Aufnahmebehälter für das Absorptionsmaterial, z. B. Natronlauge bekannter Zusammensetzung. Darüber befindet sich auf einem Siebtisch das zu untersuchende Objekt. Durch den mittleren Tubus reicht ein Rohr, das einen Dreiweghahn und ein graduiertes Gefäß trägt, zum Boden der Absorptionsschale. Durch einen anderen Tubus ist ein Tropftrichter mit dem Ablaufrohr bis in die Schalenhöhle geführt, während der dritte Tubus ein kurzes Hahnrohr trägt, das mit einem Gasbehälter unter Zwischenschaltung eines Blasen-zählers (zur Vermeidung der Diffusion) in Verbindung steht. Durch den Tropftrichter wird die Natronlauge ergänzt, von der zuvor ein abgemessenes Quantum durch den mittleren Tubus entnommen wurde, und deren Gehalt an Carbonat man titrimetrisch ermittelt. Die nachgeströmte Gasmenge, entsprechend dem Verbrauch an Sauerstoff, ist am Gasometer ablesbar. Der Gasstoffwechsel ist somit meßbar, wobei das häufig schädlich wirkende dauernde Durchleiten von Gas vermieden ist.

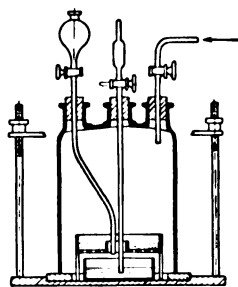


Abb. 1.

Versuch 1.

Im Versuchsraum Luft, im Gasometer Sauerstoff. Als Versuchsobjekt dient eine Kultur von *Aspergillus niger* auf Brot. Der Gasstoffwechsel ergibt sich aus folgender Tabelle:

Tag	Sauerstoffverbrauch reduziert	CO ₂ -Entwicklung
	ccm	ccm
1	60	70
2	355	290
3	400	410
4	600	660
5	560	560
Zusammen: 1975		1990

Der respiratorische Quotient ist also 1, wie ja bekannt, die Ausbeuten an fixen Säuren sind normal. Im Gärgut wurden gefunden: 11 % Citronensäure, 9 % Oxalsäure. (Die Aufarbeitung geschah durch Extraktion mit Salzsäure und Fällung mit Ammoniak; die Trennung der Säuren nach *Bulkewitsch* (2).

Versuch 2.

Im Versuchsraum Sauerstoff, im Gasometer Sauerstoff. Sonst wie Versuch 1. Tabelle des Gasstoffwechsels:

Tag	Sauerstoffverbrauch reduziert ccm	CO ₂ -Entwicklung ccm
1	180	90
2	600	590
3	1300	1110
4	1800	1630
5	1500	1280
6	450	400
7	230	270
8	0	0
9	0	0
Zusammen: 6060		5370

Das Gärgut wurde in 4 Teilen aufgearbeitet, die Ausbeuten waren:

Versuchstag:	1	2	3	4
	o/o	o/o	o/o	o/o
Oxalsäure	12,2	30,0	30,0	27,6
Citronensäure	10,2	7,2	18,4	16,0

Versuch 3.

Im Versuchsraum ein Luftstickstoffgemisch 1:1. Tabelle des Gasstoffwechsels:

Tag	Sauerstoffverbrauch reduziert ccm	CO ₂ -Entwicklung ccm
1	50	80
2	240	260
3	450	510
4	300	450
5	420	540
6	1000	890
7	420	550
8	600	500
9	400	250
10	230	200
11	150	150
Zusammen: 4260		4380

Bei diesem Versuch wurde das bemerkenswerte Resultat erhoben, daß außer den normalen Stoffwechselprodukten auch Acetaldehyd

nachweisbar war. Dieser wurde nach vorherigem qualitativen Nachweis dadurch quantitativ bestimmt, daß die das Kohlensäureabsorptionsmaterial enthaltende Schale in einer größeren stand, die mit 20 ccm n/10 Kaliumpermanganat gefüllt war. Die nicht verbrauchte Permanganatlösung konnte dann mit Oxalsäure zurücktitriert werden.

Das Gärgut wurde in vier gleichen Teilen aufgearbeitet. Es wurden gefunden:

Citronensäure	11,5;	11,5;	7,8;	9,6 %;	im Durchschnitt	10,1 %
Oxalsäure	7;	15;	26;	21 %;	„	17,2 %
Acetaldehyd	0,22 g. entsprechend 1,1 %.					

Eine derartig starke Bildung von Acetaldehyd ist bei einem Aerobier wie dem *Aspergillus niger* immerhin bemerkenswert. *C. Neuberg* und *Cohen* (3) konnten mit ihrer Abfangmethode beim *Aspergillus cellulosa*, *Monilia candida* und ähnlichen Pilzen eine starke Acetaldehydbildung nachweisen, während es ihnen beim *Aspergillus niger* mit dieser Methode nicht gelang. Nach unseren Versuchen hat es den Anschein, als ob der Pilz unter der veränderten Atmosphäre seinen Stoffwechsel zum Teil ändere und sich den veränderten Lebensbedingungen anpasse.

IV. Apparat für Tiere.

Der oben beschriebene Apparat läßt sich im Prinzip auch zu Stoffwechselmessungen an kleinen Tieren, wie Mäusen und Ratten, verwenden. Da man aber oft die Kammer für das Tier so wählt, daß es sich nicht viel bewegen kann, da andererseits ein Strömen des Gases im Versuchsraum bei diesen Objekten nicht den nachteiligen Einfluß hat, wie bei den niederen Lebewesen, so erschien es zweckmäßiger, für einen Kreislauf der Gase im Apparat zu sorgen, wobei durch Kühlung des Gases oder des Versuchsgefäßes Temperaturkonstanz im Apparat erhalten wird. Man erhält dann folgende Konstruktion:

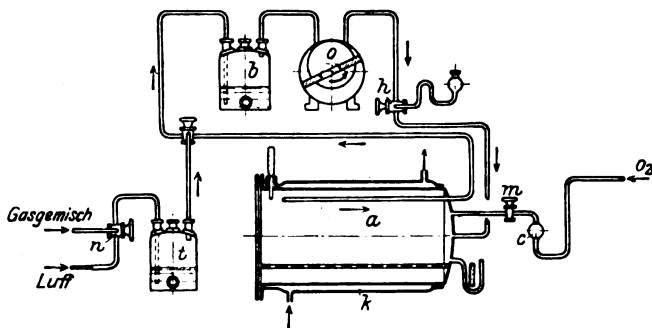


Abb. 2.

Die Pumpe *o* saugt das Gas aus dem Versuchsgefäß *a* durch die Absorptionsgefäße *b* und drückt es kohlendensäurefrei wieder nach *a* zurück. Durch den Hahn *m* kann man nach Maßgabe der absorbierten Kohlensäure Sauerstoff oder ein sauerstoffhaltiges Gasgemisch nachströmen lassen. Der Versuch zerfällt dann in drei Perioden:

1. *Periode. Einschleusen* (nur wenn nicht in Luft gearbeitet werden soll). Nachdem das Tier in das Versuchsgefäß gebracht ist, wird dieses luftdicht an die Apparatur angeschlossen und die Pumpe bei geschlossenem Hahn *m* in Betrieb gesetzt. Durch den Dreiweghahn *g* läßt man das Zusatzgas einsaugen, das man zur Erreichung des beabsichtigten Gasgemisches im Versuchsraum benötigt, während der Gasüberschuß durch den Dreiweghahn *h* entweichen kann. Hier kann man auch Gasproben zu Analysen entnehmen, um festzustellen, wann die gewünschte Gaszusammensetzung im Versuchsraum erreicht ist.

2. *Hauptperiode.* Man stellt die Hähne *g* und *h* auf *g'* und *h'*, wodurch der Kreislauf geschlossen wird, und öffnet den Hahn *m*, wodurch die Sauerstoffnachfuhr im Ausmaß der Kohlensäureabsorption automatisch aus einem Meßgefäß durch den Blasenähler *c* vor sich geht.

3. *Ausschleusen* (nur wenn mit einem anderen Gasgemisch als Luft gearbeitet wurde). Nach Beendigung des Versuchs wird *m* geschlossen, die Hähne *g* und *h* wieder auf ihre Anfangsstellung gebracht und Hahn *m* geöffnet, dadurch strömt Luft in den Apparat, während das verdrängte Gasgemisch bei *h* entweicht.

Der Sauerstoffverbrauch ist dann im Meßgefäß direkt ablesbar, die Kohlensäureproduktion durch Wägung der auswechselbaren Absorptionsgefäße oder durch Titration der zur Absorption dienenden Natron- oder Kalilauge zu ermitteln.

Beispiele. 1. Einfluß von Thyroxin auf den Gaswechsel von Mäusen. Der beschriebene Apparat diente an Stelle des von *Haffner* (4) beschriebenen zur Standardisierung von Schilddrüsenpräparaten.

2. Beeinflussung der Tumoren nach *Warburg*. Gegen die Strömungsmethode *Warburgs* bietet der Apparat den Vorteil größerer Wirtschaftlichkeit.

Wir sehen davon ab, einzelne Ergebnisse genauer zu beschreiben, da wir auf diese bei der Veröffentlichung der einzelnen Versuchsreihen zurückkommen werden, möchten hier nur noch bemerken, daß es gelingt, Mäuse und Ratten in einem Gasgemisch mit nur etwa 4% Sauerstoff über 3 Tage am Leben zu halten, und ein Hund ohne Schaden in einem Gasgemisch von nur 5% Sauerstoff mehrfach 2 Stunden lang ohne Allgemeinschädigung gehalten werden konnte.

V. Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Apparatur geschildert, welche gestattet, Lebensvorgänge an niederen und hoch organisierten Lebewesen unter veränderten atmosphärischen Bedingungen zu verfolgen, derart, daß man die gewünschte atmosphärische Variation auf jeden beliebigen Grad einstellen und konstant halten kann.

Das Verfahren arbeitet bei atmosphärischem Druck; von physiologischen Bedingungen unterscheidet es sich durch die Herabsetzung der Kohlensäurespannung der Atemluft unter die Norm.

Literatur.

1) *Warburg und Negelein*, Naturwissenschaften **14**, 439. — 2) *Butkevitch*, diese Zeitschr. **181**, 327, 1922. — 3) *Neuberg und Cohen*, ebendasselbst **112**, 140 und 204, 1920. — 4) *Haffner und Komiyama*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **107**, 69.

Kolorimetrische Bestimmung von o-Dioxybenzolen.

Von

Hans Schmalfuß, Karl Spitzer und Hans Brandes.

(Mitteilung aus dem Chemischen Staatsinstitut Hamburg, Universität.)

(Eingegangen am 9. August 1927.)

In jüngster Zeit wurde in einer Reihe von Arbeiten¹ darauf hingeezielt, „Melanin“-Bildner der o-Dioxybenzolreihe zu isolieren. Hierzu ist es nötig feststellen zu können, ob in den einzelnen Fraktionen „Melanogen“ vorhanden und angereichert ist.

Für Tyrosin und 1- β -3,4-Dioxyphenyl- α -aminopropionsäure sind diese Methoden bereits geschaffen². Es fehlte aber bisher noch ein möglichst allgemein verwendbares Verfahren, kleine Mengen von o-Dioxybenzolen *ohne Rücksicht auf sonstige Substituenten* kolorimetrisch zu bestimmen. O. v. Fürth³ hatte schon die Bedeutung einer solchen Methode für das Isolieren von o-Dioxybenzolen erkannt. Er schlug vor, diese Stoffe als Eisenverbindungen in alkalischer Lösung kolorimetrisch zu bestimmen. Doch spricht er selbst von einer nur „approximativen Schätzung“³. Auch schreibt er⁴: „Der kolorimetrische Vergleich von alkalischen Lösungen der Suprarenin-Verbindung mit analogen eisenhaltigen Brenzkatechinlösungen ergab für die letzte eine ungefähr drei- bis dreieinhalbmal größere Farbkraft als für die ersten.“

O. v. Fürth nimmt also von vornherein einen Fehler von 14 % mit in Kauf. Außerdem braucht er einen erheblichen empirischen Faktor, um mit seiner Methode äquivalente Mengen verschiedener o-Dioxybenzole zu ermitteln.

¹ H. Schmalfuß und H. Werner, B. 58, 2763, 1925; H. Schmalfuß und H. P. Müller, diese Zeitschr. 183, 362, 1927; H. Przibram und H. Schmalfuß, ebendasselbst 187, 467, 1927.

² Diesem Zwecke dienten die Arbeiten: H. Schmalfuß und H. Werner, Fermentforschung 8, 423, 1925; H. Schmalfuß und H. Lindemann, diese Zeitschr. 184, 10, 1927.

³ Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 115, 1900.

⁴ Beitr. z. chem. Physiol. 1, 244, 1902.

Empirische Faktoren sind hier aber prinzipiell unbrauchbar, weil man ja das Melanogen noch nicht kennt, das man isolieren will. *R. Weinland* und *K. Binder*¹ haben inzwischen durch ihre Arbeiten gezeigt, welche Schwierigkeiten der Kolorimetrie von Brenzkatechinverbindungen mittels Ferri-Ion entstehen.

Je nach der Konzentration der beteiligten Stoffe und der Wasserstoffionenkonzentration entstehen verschiedene Eisenverbindungen, die verschieden gefärbt sind. Trotzdem mußte es möglich sein, Bedingungen zu finden, die das Kolorimetrieren von o-Dioxybenzolen mit Ferri-Ion gestatten, ähnlich wie *A. Bernoulli*² geeignete Bedingungen für die Bestimmung von Eisen mittels eines Brenzkatechinüberschusses hatte finden können. Doch ist der umgekehrte Fall schwieriger. Denn das an sich gefärbte Ferri-Ion muß im Überschuß vorhanden sein und bedingt daher einen störenden Blindwert. Dieser Blindwert nimmt außerdem noch mit abnehmender Brenzkatechinmenge zu. Schließlich muß das Ferri-Ion in genügender Konzentration³ in alkalischem Medium (da sich das saure und das neutrale Gebiet als ungeeignet erwiesen) durch einen unschädlichen Stoff in Lösung gehalten werden.

Hierzu eignet sich Rohrzucker⁴ vorzüglich. Der Blindwert einer solchen alkalischen Eisenlösung ist bei geeigneter Konzentration kleiner als der Ablesefehler⁵.

Der Meßbereich dieser kolorimetrischen Methode erstreckt sich etwa von $1,12 \cdot 10^{-5}$ bis $7 \cdot 10^{-7}$ Mol.

Der Fehler der Methode ist gleich dem Ablesefehler des *Wolffschen* Ablaufkolorimeters, $\pm 3\%$.

Arbeitsvorschrift: Es empfiehlt sich, die Konzentration der Vergleichslösung etwa halb so hoch bis ebenso hoch zu wählen wie die der zu messenden Lösung. Wir verwandten z. B. folgende Vergleichslösung: 1 ccm einer 0,05 %igen Brenzkatechinlösung wird in dem einen Meßzylinder des *Wolffschen* Ablaufkolorimeters mit 1 ccm einer 60-(Ge-

¹ B. 45, 148 bis 154, 1113 bis 1124, 1912; 46, 874 bis 885, 1913.

² Helv. 9, 827 bis 840, 1926.

³ Die Ferri-Ionenkonzentration in eisengesättigter Kalilauge (*H. Schmalfuß* und *H. Barthmeyer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 160, 196, 1926) genügt nicht.

⁴ Vgl. hierzu *A. Archetti*, Chem.-Ztg. 26, 555, 1902.

⁵ Gewiß könnte man zur dunkleren Lösung sehr wenig von der Eisen-Zuckerlösung so lange tropfenweise hinzusetzen, bis die Farbtöne und damit die Blindwerte der beiden Lösungen praktisch gleich sind. Gewiß könnte man auch im monochromatischen Licht arbeiten (*O. v. Fürth* und *E. Jerusalem*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 149, 1907). Es ist jedoch einfacher und genügend genau, auf gleiche scheinbare Helligkeit zu kolorimetrieren, ohne die geringen Unterschiede im Farbton zu berücksichtigen, was nach einiger Übung des Auges leicht gelingt.

wichts-)%igen Rohrzuckerlösung, der für je 100 ccm 0,2 g sublimiertes Ferrichlorid zugefügt sind, versetzt und mit gesättigter wässriger Natriumcarbonatlösung bis zum Teilstrich 100 aufgefüllt.

In entsprechender Weise werden 1 bis 2 ccm der zu untersuchenden Lösung im *anderen* Meßzylinder des Kolorimeters mit 1 ccm der Eisen-Zuckerlösung versetzt und mit der gesättigten Natriumcarbonatlösung ebenfalls bis zum Teilstrich 100 aufgefüllt. Kolorimetriert wird auf gleiche scheinbare Helligkeit¹.

Beispiele: Äquimolekulare Lösungen von Brenzkatechin, Protokatechualdehyd, Protokatechusäure, Adrenalin und 1- β -3, 4-Dioxy-phenyl- α -aminopropionsäure wurden mit Hilfe der Brenzkatechinvergleichslösung gemessen:

Nr.	Analyselösung		Gefunden als Mittel * aus 10 Ablesungen	Berechnet	Fehler %
	Art	Menge ccm			
1a	Brenzkatechin	2,00	49,96	50,00	— 0,08
1b	"	1,40	70,04	71,43	— 1,95
2a	Protokatechualdehyd	1,55	65,71	64,51	+ 1,86
2b	"	2,15	46,59	46,51	+ 0,17
3a	Protokatechusäure	1,20	84,11	83,33	+ 0,94
3b	"	1,25	80,67	80,00	+ 0,84
4a	Adrenalin	1,55	65,48	64,51	+ 1,53
4b	"	1,10	92,93	90,91	+ 2,22
5a	1- β -3, 4-dioxyphenyl- α -aminopropionsäure	1,85	55,33	54,05	+ 2,37
5b	Dieselbe	1,50	67,22	66,66	+ 0,84

* Der Stand der Vergleichslösung, die 1 ccm Brenzkatechinlösung enthielt, war stets gleich 100.

Ob in einem Extrakt Begleitstoffe vorhanden sind, die die Kolorimetrie stören, läßt sich feststellen, indem eine bekannte Menge Brenzkatechin zu einem gemessenen Extraktanteil zugesetzt und die Zunahme an Brenzkatechin kolorimetriert wird.

¹ Wenn sich Farbton und Farbtiefe beim Stehen auch nur wenig ändern, so empfiehlt es sich doch, die Vergleichslösung jeweils neu anzusetzen. Die Eisenzuckerlösung bleibt etwa 2 Tage brauchbar.

Warum schwärzen sich die Hülsen von *Sarothamnus scoparius* Wimm., dem Besenginster?

Von

Hans Schmalfuß, Helene Barthmeyer und Hans Brandes.

(Mitteilung aus dem Chemischen Staatsinstitut Hamburg, Universität.)

(Eingegangen am 9. August 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Der braunschwarze Farbstoff der Hülsen von *Sarothamnus scoparius* Wimm. gehört in die Gruppe der „Melanine“¹. Damit sich die Hülsen schwärzen können, muß vorher „*Melanogen*“ gebildet sein. Bisher ist dieses Melanogen nicht bekannt, und man weiß nicht, wann es entsteht. Würde es erst unmittelbar vor dem Schwarzwerden der Hülsen entstehen, so wäre die Frage, warum sich die Hülsen schwärzen, leicht zu beantworten.

Wir fanden jedoch, daß das Melanogen — übrigens ein Stoff der o-Dioxybenzolreihe — auch schon in den jungen Hülsen vorhanden ist. Trotzdem schwärzen sie sich nicht. Dies könnte daran liegen, daß der Zellsaft der grünen Hülsen eine wesentlich andere *Wasserstoffionenkonzentration* besäße als der Zellsaft der sich schwärzenden Hülsen. Manche Melanogene gehen nämlich in alkalischem Medium bei Gegenwart von Sauerstoff und Wasser spontan in Melanin über. Messungen mit der Gaskette² ergaben jedoch, daß die Wasserstoffionenkonzentration in beiden Fällen nahezu gleich war und etwa 10^{-5} betrug.

Das Melanin muß sich demnach fermentativ bilden, und der Schwärzungsvorgang könnte darauf beruhen, daß das nötige *Ferment* erst unmittelbar vor der Schwärzung entstände.

¹ Melanin ist ein Sammelname für braunschwarze bis schwarze Pigmente, die vornehmlich aus Phenolarten durch Oxydation entstehen.

² Wir danken der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft für die Apparate.

Aber auch die jungen Hülsen enthalten Ferment. Denn schon kleine Mengen Preßsaft ließen m/450 p-Oxy- und m/100 3,4-Dioxyphenylalaninlösungen dunkeln. Durch Kochen wurde das Ferment inaktiviert. Entsprechend verhinderte 10 Minuten langes Erhitzen der grünen Hülsen im Einschmelzrohr auf 95° das Schwarzwerden. Wurde nur die eine Hälfte einer Hülse genügend lange in Wasserdampf erhitzt, so dunkelte nur noch die ungenügend erhitzte Hälfte. Da also schon genügend Ferment vor der Reifung vorhanden ist, kann *Auftreten* von Ferment nicht der Grund sein für das Schwarzwerden der Hülsen.

Damit sich Melanin bilden kann, ist weiter *Wasser*¹ nötig.

An Wasser fehlt es den jungen Hülsen jedenfalls nicht. Denn entzieht man den Hülsen im Exsikkator einen Teil des Wassers, so schwärzen sie sich sogar schneller, als wenn sie feucht gehalten werden. Auch in der Natur werden die Hülsen in dem Maße dunkler, wie sie trockner werden. Die noch grünen Hülsen sind biegsam, die gedunkelten, reiferen brüchig. Das widerspricht unserer Auffassung, daß Wasser zur Melaninbildung nötig ist. Aber nur scheinbar. Denn wird den grünen Hülsen in geeigneter Weise im Exsikkator *genügend* Wasser entzogen, so dunkeln die Hülsen nicht mehr. Erst wenn sie dann ein wenig in Wasser eingeweicht werden, dunkeln sie.

Da schließlich als letzte Voraussetzung für das Entstehen von Melanin nur noch *Sauerstoff* in Frage kommt, der in der Luft überreichlich vorhanden ist, lautet das Problem, wie man sieht, nicht mehr: „Warum schwärzen sich die Hülsen von *Sarothamnus scoparius* Wimm. ?“ sondern: „Warum schwärzen sich die jungen Hülsen von *Sarothamnus scoparius* Wimm nicht?“

Wir zeigten nun zunächst, daß Fehlen von Sauerstoff das Dunkeln der Hülsen jedenfalls völlig verhindert. Doch ließe sich hier einwenden, nicht Sauerstoff-Mangel selbst, sondern durch ihn bedingte Hemmung von Lebensprozessen wäre dafür verantwortlich zu machen, daß sich die Hülsen nicht schwärzen. Deshalb wurden Hülsen zum Teil in flüssigem, zum Teil in gasförmigem Chloroform abgetötet und dann dem Luftsauerstoff ausgesetzt. Auffälligerweise schwärzten sich die Hülsen nun noch schneller als bei Abwesenheit von Chloroform. Damit ist zunächst bewiesen, daß nicht die Hemmung von Lebensprozessen, sondern Sauerstoffmangel unmittelbar, das Schwarzwerden der grünen Hülsen verhindert.

Das mikroskopische Bild zeigte nun, daß die Hauptmenge des Melanins in der Epidermis und in den Chlorophyll-führenden Schichten

¹ H. Schmalfuß und H. Werner, Fermentforschung 8, 133, 1924.

der Hülsen abgelagert wird. In den grünen Hülsen muß also der *Sauerstoffdurchtritt durch die Kutikula* zu diesen Stellen langsamer sein als der Sauerstoffverbrauch durch nicht-Melanin-bildende Prozesse in den äußeren Schichten. Das läßt sich auf verschiedene Art direkt beweisen: Man kann die Hülsen mit einem Platindraht ritzen. Dann färben sich nur die geritzten Stellen, wie die Abb. 1 zeigt. Oder man kann den Reif vorsichtig abwischen oder noch besser durch kurzes Eintauchen in Chloroform oder Äther lösen. Dann bräunt sich das Gewebe an den Stellen, wo der isolierende Wachsüberzug entfernt ist, im Laufe weniger Minuten.

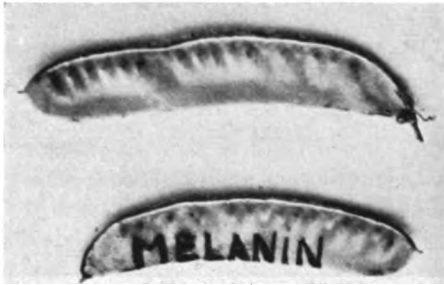


Abb. 1.

Natürliche Größe. Unten das Wort „Melanin“ eingeritzt.

Aus den angeführten Versuchen ergibt sich, daß die grünen Hülsen erst dann dunkeln, wenn genügend Sauerstoff durchgelassen wird. In der Natur geschieht das in selteneren Fällen durch Verletzen der Hülsen. Der normale Vorgang ist jedoch, daß die Durchlässigkeit durch Austrocknen vergrößert wird. Der Luftsauerstoff dringt dann in die Melanogen führenden Schichten ein. Auch kann die Austrocknung, ebenso die Behandlung mit Chloroform, dazu führen, daß Lebensprozesse erlahmen, die begieriger Sauerstoff verschlangen als das Melanogen.

Zum Schluß danken wir Herrn Privatdozent Dr. E. Heitz vom Botanischen Institut der Hamburgischen Universität für seine freundliche Beratung in botanischen Fragen.

Zusammenfassung.

1. Das Melanogen der Hülsen von *Sarothamnus scoparius* Wimm. wurde als ein Stoff der o-Dioxybenzolreihe erkannt.
2. Schon in den grünen Hülsen sind Melanogen, eine geeignete Wasserstoffionenkonzentration, geeignetes Ferment und genügend Wasser zugegen, doch fehlt es an der nötigen Menge Sauerstoff.

3. Die Hülsen schwärzen sich erst dann, wenn genügend Sauerstoff in die Epidermis und die chlorophyllführenden Schichten, die das Melanogen enthalten, eingedrungen ist. Das geschieht beim allmählichen Eintrocknen der Hülsen oder nach Verletzen der Kutikula.

In einer weiteren Arbeit soll über das Melanogen der Hülsen von *Sarothamnus* berichtet werden. Wir bitten im Interesse des ungestörten Fortgangs der Arbeit, uns diese Untersuchung überlassen zu wollen.

Über den relativen Nährwert der Fette. II.

Von

Junichi Ozaki.

(Mitgeteilt von Prof. U. Suzuki aus dem agrikulturchemischen Laboratorium der Universität Tokio, Komaba.)

(Eingegangen am 11. August 1927.)

Mit 14 Abbildungen im Text.

Bei der Fortsetzung der vorigen Arbeit¹ hat der Verfasser eine Reihe von Fütterungsversuchen mit weißen Ratten ausgeführt, um den Nährwert der synthetischen Fette, Aldehyde, freien Säuren sowie der Ester und Seifen zu bestimmen, deren Ergebnis hier kurz mitgeteilt wird.

I. Versuche mit synthetischen Fetten, die aus Fettsäuren mit geraden C-Atomen bestehen.

Die in diesem Versuch gebrauchten Fette wurden vom Verfasser aus gereinigten Fettsäuren und Glycerin mittels *Twitchellschem* Reagens dargestellt und ihr Nährwert durch Fütterungsversuche der weißen Ratten analog den Angaben der vorigen Arbeit bestimmt, d. h. die jungen Ratten wurden vorher mit einer beschränkten Menge (9 g pro Ratte und Tag) Grundfutter, welches aus 80 % Stärke, 15 % Fleischpulver, 5 % *McCollums* Salzgemisch nebst 4 % käuflicher Oryzaninlösung und 0,1 Biosterin bestand, gefüttert. Als das Wachstum zum Stillstand kam, wurden dem Grundfutter je 5, 10 und 20 % der zu untersuchenden Fette zugesetzt und dieses den Tieren gegeben. Die dadurch hervorgerufene Gewichtszunahme wurde als Maßstab des relativen Nährwerts der untersuchten Fette gewählt. In dieser Weise erhielt der Verfasser die folgenden Resultate.

¹ Diese Zeitschr. 177, H. 1/3, 156 bis 167, 1926.

Zugesetztes Fett	Gewichtszunahme in g durch Zusatz von			
	gesättigten Fetten		ungesättigten Fetten	
5 %	Caprin	34,0	Olein	43,0
	Acetin	33,0	Rapin	35,0
	Myristin	31,0	Erucin	23,5
	Laurin	31,0	Linolin	21,5
	Caprylin	27,0	Linolein	18,0
	Butyrin	20,0	Elaidin	10,5
	Palmitin	18,0	Isovaleriansäure	
	Stearin	10,0	+ Glycerin	10,0
			Δ^a -Olein	5,0
			Δ^a -Palmitolein	3,0
			Iwashin	2,5
			Stearolin	1,0
			Undecin	—
10 %	Laurin	51,5	Olein	53,0
	Myristin	47,0	Rapin	50,5
	Caprin	40,5	Erucin	49,0
	Caprylin	35,5	Linolin	24,5
	Acetin	26,0	Linolein	14,0
	Palmitin	26,0	Elaidin	14,0
	Stearin	16,5	Δ^a -Olein	3,5
	Butyrin	16,0	Iwashin	—
			Stearolin	—
20 %	Laurin	15,0	Olein	46,5
	Myristin	14,0	Rapin	14,0
	Palmitin	4,5	Linolin	1,0
	Stearin	4,5	Elaidin	—
	Butyrin	4,0	Stearolin	—
	Acetin	—		

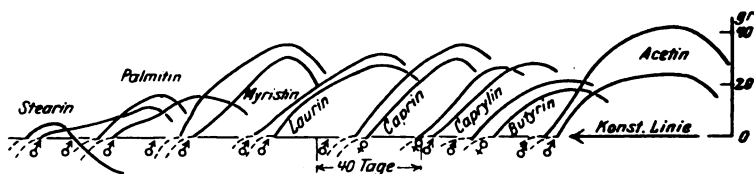


Abb. 1.

Fütterungsversuche mit synthetischen Fetten, die aus Fettsäuren von geraden Kohlenstoffatomen bestehen. Gewichtszunahme der Ratten nach dem Zusatz von je 5 % der zu untersuchenden Fette zum Grundfutter.

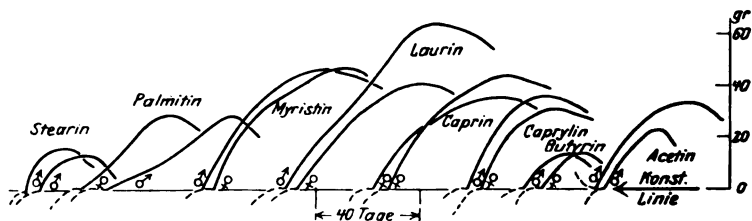


Abb. 2.

Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 10 % der Fette zum Grundfutter.

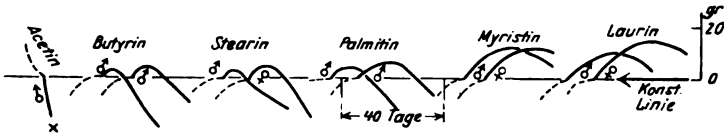


Abb. 3.

Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 20 % der Fette zum Grundfutter.

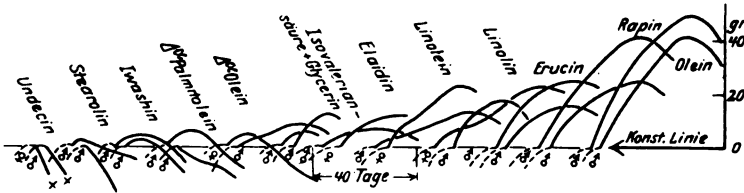


Abb. 4.

Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 5 % der ungesättigten Fette zum Grundfutter.

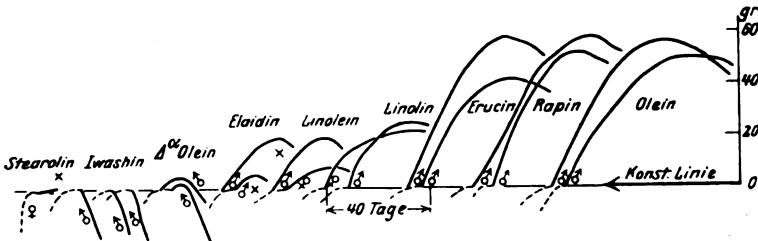


Abb. 5.

Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 10 % der Fette zum Grundfutter.

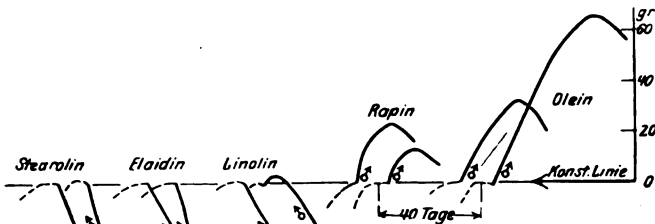


Abb. 6.

Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 20 % der Fette zum Grundfutter.

Faßt man die obigen Resultate zusammen, so kommt man zu folgendem Schluß:

1. Unter gesättigten Fetten haben Laurin und Myristin den höchsten Wert.
2. Von Acetin bis zum Myristin nimmt der Nährwert mit dem Molekulargewicht zu.

3. Keines der gesättigten Fette zeigte so giftige Wirkung wie Isovalin oder Undecin.

4. Unter gesättigten Fetten hat Laurin den höchsten Wert.

5. Bei Olein, Linolin, Linolein und Iwashin nimmt der Nährwert mit der Zunahme der ungesättigten Bindung ab.

6. Diejenigen, die zwischen α - und β -Stellung ungesättigte Bindung aufweisen, sind minderwertiger als die entsprechenden gesättigten Fette; Isovalerin ist die einzige Ausnahme. Es wurde besser ausgenutzt als das gesättigte Fett Isovalin.

7. Diejenigen Fette, welche dreifache Bindung besitzen, wie Stearolin und Undecin erwiesen sich giftig.

8. Im allgemeinen wurden die Fette mit geraden C-Atomen, d. h. die in der Natur vorkommenden besser als diejenigen mit ungeraden C-Atomen ausgenutzt.

II. Versuche mit aliphatischen Aldehyden.

Gewichtszunahme durch Zusatz von je 5 % der verschiedenen Aldehyde:

Margarinaldehyd	23,0 g	Palmitinaldehyd	17,5 g
Pentadecylinaldehyd	15,0 g	Acetaldehyd	13,0 g
Acelainsäure	13,0 g	Myristinaldehyd	6,5 g
Heptoinaldehyd	4,5 g	Butteraldehyd	0,5 g
Propionaldehyd	0,5 g	Isovaleraldehyd	—

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die niedrigen Aldehyde minderwertiger sind. Einige von ihnen haben sogar Giftwirkung. Die höheren Glieder, wie Margarin, Palmitin- und Pentadecylinaldehyd, wurden dagegen ziemlich gut ausgenutzt. Unerwartet gutes Resultat wurde mit Acetaldehyd, welche früher als giftig betrachtet wurde, erzielt. Durch Zusatz von größeren Dosen wird er jedoch ungünstig wirken (Abb. 7).

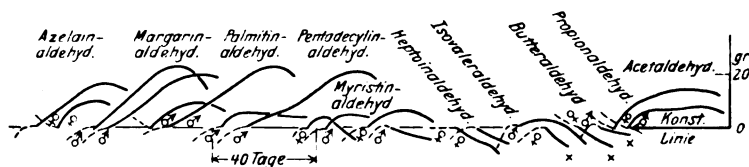


Abb. 7.

Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 5 % der Aldehyde zum Grundfutter.

III. Versuche mit Methyl- und Äthylester der Fettsäuren.

Gewichtszunahme durch Zusatz von je 10 % der Ester:

Myristinsaures Äthyl	49,0 g	Palmitinsaures Äthyl	28,5 g
Laurinsaures Äthyl	49,0 g	Stearinsaures Äthyl	26,0 g
Myristinsaures Methyl	48,0 g	Oleinsaures Äthyl	26,0 g
Laurinsaures Methyl	45,0 g	Elaidinsaures Äthyl	10,0 g

Im allgemeinen werden die Ester besser als die entsprechenden Glyceride ausgenutzt. Besonders ist dies der Fall bei den Estern der Palmitin- und Stearinsäure, welcher Umstand dem niedrigeren Schmelzpunkt und der besseren Assimilation dieser Ester zuzuschreiben ist.

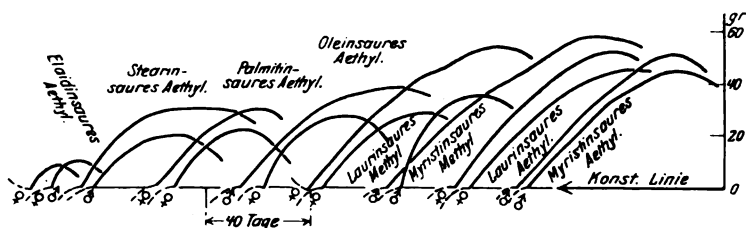


Abb. 8.

Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 10 % der Ester zum Grundfutter.

Der Verfasser nimmt an, daß wenigstens ein Teil der Ester als solcher ohne Verseifung vom Darmkanal absorbiert wird; sonst müßte der Nährwert der Ester viel niedriger sein, weil die durch Verseifung entstehenden freien Säuren immer niederen Wert besitzen (Abb. 8).

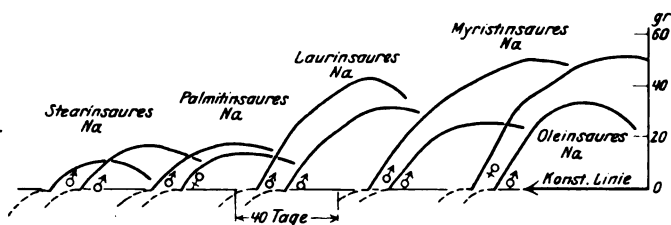


Abb. 9.

Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 10 % der Seifen zum Grundfutter.

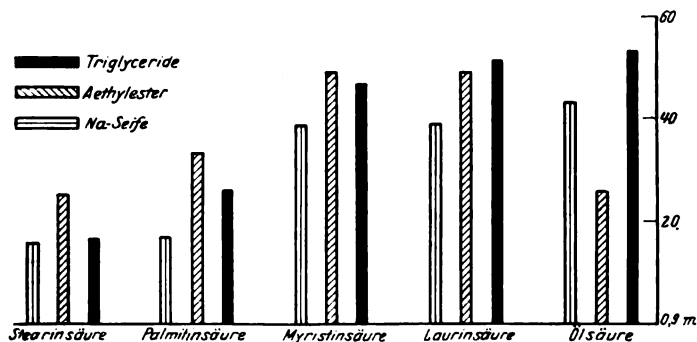


Abb. 10.

IV. Versuche mit Natronseifen.

Gewichtszunahme durch Zusatz von je 10% der Seifen:

Oleinsaures Natron . . .	43,5 g	Laurinsaures Natron .	39,0 g
Myristinsaures Natron .	39,0 g	Palmitinsaures Natron	17,5 g
Stearinsaures Natron . .	16,0 g		

Hieraus wird es ersichtlich, daß diese Seifen ebensogut wie die entsprechenden Glyceride ausgenutzt werden (Abb. 9).

Abb. 10 stellt die Nährwerte der Seifen, Ester und Glyceride der Stearin-, Palmitin-, Myristin- und Laurinsäure graphisch dar.

V. Versuche mit freien Fettsäuren.

Gewichtszunahme durch Zusatz von je 10% der Fettsäuren:

Oleinsäure	39,0 g	Myristinsäure	6,0 g
Palmitinsäure	26,0 g	Laurinsäure	0,5 g
Elaidinsäure	17,0 g	Heptoinsäure	—
Stearinsäure	12,5 g		

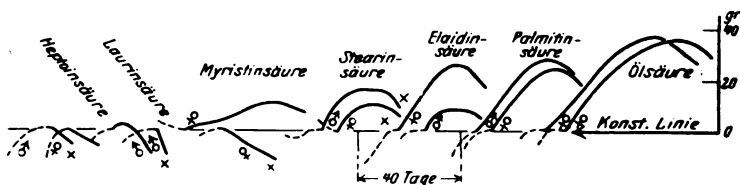


Abb. 11.

Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 10% der Fettsäuren zum Grundfutter.

VI. Versuche mit Gemischen aus Fettsäuren und Glycerin.

Die freien Fettsäuren und Glycerine werden in demselben Mengenverhältnis, wie sie in Triglyceriden vorhanden sind, gemischt, und je 10% dieser Mischung wurden dem Grundfutter zugesetzt. Die Gewichtszunahme hierbei betrug:

Oleinsäure	+	Glycerin	39,0 g
Palmitinsäure	+	„	24,0 g
Stearinsäure	+	„	10,0 g
Laurinsäure	+	„	27,0 g
Myristinsäure	+	„	23,0 g

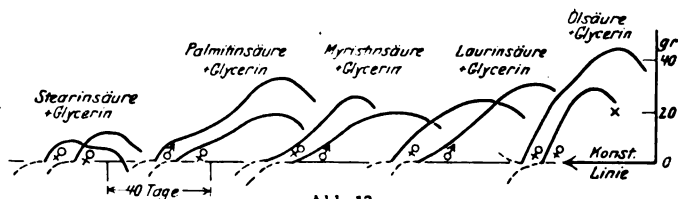


Abb. 12.

Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 10% der Gemische aus Fettsäuren und Glycerin zum Grundfutter.

Abb. 13 gibt die graphische Darstellung der Nährwerte der freien Fettsäuren, Fettsäuren + Glycerin und Triglyceride.

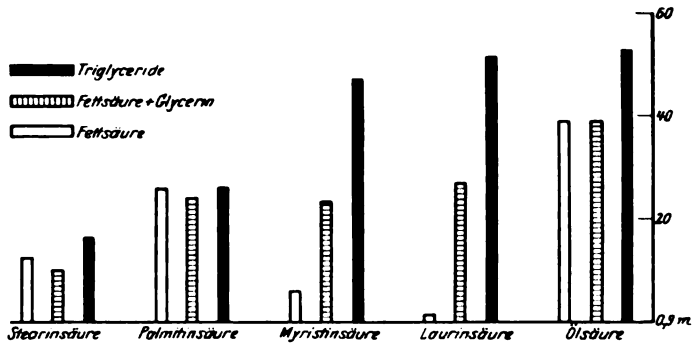


Abb. 13.

Der Unterschied der Nährwerte der freien Säuren und Glyceride bei Palmitin- und Stearinsäure ist nicht so groß wie bei Laurin- und Myristinsäure, was vielleicht der stärkeren Acidität der beiden letzten Säuren zuzuschreiben ist. Die niederen Fettsäuren verbrauchen natürlich mehr Alkali zur Neutralisation als die höheren Säuren. Sie entziehen mehr Alkali aus dem Verdauungssaft und auch aus dem Blute und stören infolgedessen den Verdauungsprozeß. Durch gleichzeitigen Zusatz von Alkali und Fettsäuren werden in der Tat sehr gute Resultate erzielt; dies wurde durch die Versuche mit den Natronseifen bewiesen. Die höheren Fettsäuren verbrauchen weniger Alkali zur Neutralisation; ferner passiert ein Teil der Säuren unabsorbiert den Verdauungskanal, wie sich aus folgendem Versuch ergibt.

VII. Die Absorption der Fette.

Der Absorptionskoeffizient der Fette wurde durch Fütterungsversuche der weißen Ratten in gewöhnlicher Weise ermittelt, indem die Fette im Futter und Exkrementen quantitativ bestimmt wurden. Im folgenden sind die Resultate zusammengestellt:

1. Freie Fettsäuren.

	Absorptions- koeffizient	Schmelz- punkt		Absorptions- koeffizient	Schmelz- punkt
Stearinsäure . .	59,3	69,0	Laurinsäure . .	97,5	44,0
Palmitinsäure . .	63,4	62,0	Oleinsäure . .	91,0	14,0
Myristinsäure . .	94,8	54,0	Elaidinsäure . .	75,5	44,0

2. Natronseifen.

	Absorptions- koeffizient		Absorptions- koeffizient
Natriumstearat	60,5	Natriumpalmitat	76,8
Natriumoleat	95,1	Natriummyristat	94,8

3. Triglyceride.

	Absorptions- koeffizient		Absorptions- koeffizient
Stearin	60,8	Caprin	100,7
Olein	97,0	Caprylin	98,7
Palmitin	65,7	Butyrin	100,0
Myristin	98,3	Acetin	98,7
Laurin	98,3		

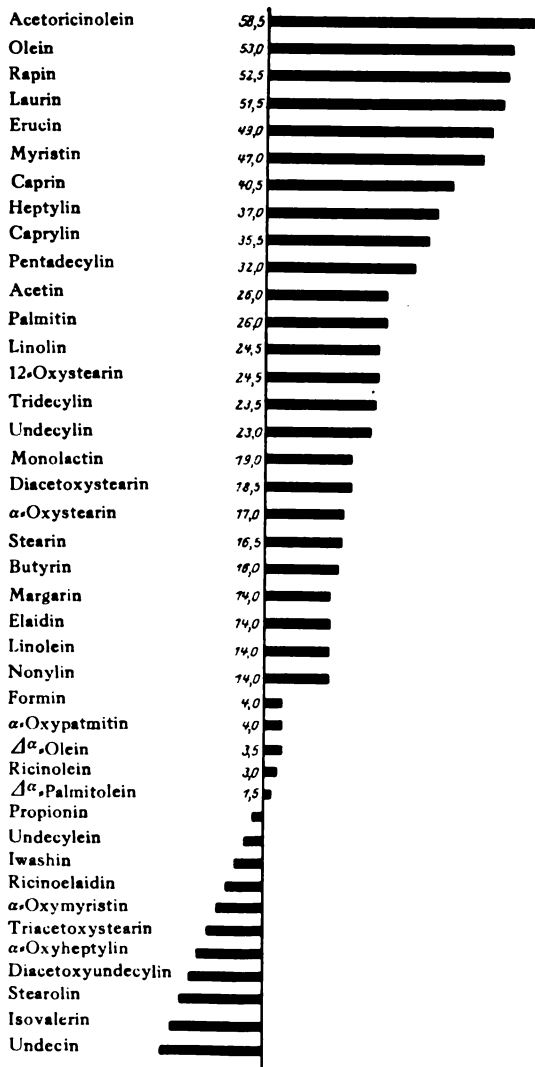


Abb. 14.

Aus den obigen Tabellen ersieht man, daß die durch Fütterungsversuche ermittelten Nährwerte ziemlich gut mit den Absorptionskoeffizienten übereinstimmen; ferner ist es ersichtlich, daß die Absorption der Fette nicht allein vom Schmelzpunkt der letzteren abhängt, sondern die chemische Natur der Fette scheint eine noch größere Rolle zu spielen.

Die relativen Nährwerte der verschiedenen Triglyceride werden in Abb. 14 graphisch dargestellt. (Gewichtszunahme durch Zusatz von je 10 % zum Grundfutter.) Die Werte von Fetten mit ungeraden C-Atomen und von Oxydfetten werden von voriger Mitteilung¹ zitiert.

¹ Diese Zeitschr. 177, H. 1/3, 156 bis 167, 1926.

Stoffwechsel wachsender Zellen (Fibroblasten, Herz, Chorion).

Von

Otto Warburg und Fritz Kubowitz.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 9. September 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Alle Erfahrungen¹ über den Stoffwechsel der Körperzellen kann man folgendermaßen zusammenfassen:

Normales Wachstum außer Netzhaut	Carcinome und Sarkome (Mensch, Huhn, Ratte)	Netzhaut
$Q_M^{N_2} < 50 \quad (1)$	$Q_M^{N_2} < 50 > 20 \quad (1a)$	$Q_M^{N_2} \geq 200 \quad (1b)$
$\frac{d Q_M^{N_2}}{dt} < 0 \quad (2)$	$\frac{d Q_M^{N_2}}{dt} = 0 \quad (2a)$	$\frac{d Q_M^{N_2}}{dt} > 0 \quad (2b)$
$U < 0 \quad (3)$	$U > 0 \quad (3a)$	$U > 0 \quad (3b)$

Hier ist $Q_M^{N_2}$ die anaerobe Glykolyse, t die Entwicklungszeit und U der Überschuß der anaeroben Glykolyse über die doppelte Atmung ($U = Q_M^{N_2} - |2 Q_{O_2}|$).

Gehen die Körperzellen zugrunde, so werden sämtliche Beziehungen ungültig, im Endzustand ist

$$Q_M^{N_2} = 0, \quad Q_{O_2} = 0.$$

Doch muß man bedenken, daß der Endzustand nicht plötzlich, sondern allmählich erreicht wird. Sinkt dabei die Atmung schneller als die Gärung, so kann U für normale Zellen positiv werden, wie in den roten und weißen Zellen des Blutes. Sinkt andererseits die Gärung schneller als die Atmung, so kann U für Carcinomzellen negativ werden.

In dieser Mitteilung werden die Beziehungen (1) bis (3) durch neue Beispiele belegt.

¹ Vgl. O. Warburg, diese Zeitschr. 184, 484, 1927; H. A. Krebs, ebendasselbst 189, 56, 1927; C. Tamiya, ebendasselbst 189, 114, 175, 1927.

1. Fibroblasten¹.

Die Fibroblasten wurden nach *Carrel* in Plasma-Embryonalsaft auf Deckgläsern gezüchtet, ihr Stoffwechsel in Hühnerserum gemessen. Zur Kontrolle wurden Fibroblastenkulturen gemessen, die von Dr. *Albert Fischer* aus dem ersten *Carrel*schen Stamme gezüchtet waren. Dieser Stamm lebt seit 16 Jahren in Deckglaskultur und ist etwa 3000mal überpflanzt worden.

Das Trockengewicht eines Gewebestücks war von der Größenordnung 10^{-2} mg. 50 bis 70 Gewebestücke waren für einen Stoffwechselversuch notwendig. Von 100 bis 150 Kulturen wurden 48 Stunden nach der Überpflanzung die besten ausgewählt, mit einem Messer aus dem Nährboden herausgeschnitten und mit warmem Hühnerserum längere Zeit gespült, um das anhaftende Plasma zu entfernen. Dann wurden die Gewebestücke in einen Meßtrog gebracht, der frisches, durch spontane Gerinnung erhaltenes Hühnerserum enthielt. Die Messung geschah manometrisch, zuerst in Sauerstoff, dann in Stickstoff, der über Kupfer gegläht war. Wegen der Ungleichartigkeit des Materials war hier das Einzelgefäß mit variiertem v_F dem Gefäßpaar vorzuziehen.

Wurde in *Carrel*schen Schalen statt auf Deckgläsern gezüchtet, so waren die Resultate schlechter und unregelmäßiger, wahrscheinlich, weil die über dem Gewebe liegende Plasmaschicht bei der Schalenkultur dicker und inkonstanter war als bei der Deckglaskultur. Züchtungsmethoden, die für histologische Zwecke genügen, sind für Stoffwechselversuche, bei denen Gleichartigkeit des Materials verlangt wird, nicht immer brauchbar.

Tabelle I enthält das Ergebnis der Messungen, Protokoll 1 zwei vollständige Versuche. Der Stoffwechsel ist am größten in frisch angelegten Kulturen, sinkt bis zur dritten oder vierten Überpflanzung und bleibt dann konstant. Nach 6- und 3000maliger Überpflanzung war der Stoffwechsel ungefähr gleich.

48 Stunden nach der ersten Überpflanzung enthält die Kultur noch beträchtliche Mengen Ursprungsgewebe, das ist Herz neuntägiger Hühnerembryonen. Nach Abb. 1 liegt $Q_M^{N_2}$ für Herzen neuntägiger Embryonen unter 15, während für Fibroblastenkulturen 48 Stunden nach der ersten Überpflanzung $Q_M^{N_2}$ -Werte von 40 bis 50 gefunden wurden. Der große Stoffwechsel der jungen Kulturen ist also nicht der Stoffwechsel des Ursprungsgewebes.

¹ Über den Stoffwechsel von Gewebekulturen vgl. auch *F. Wind*, diese Zeitschr. 179, 384, 1926.

Vergleichen wir die beiden letzten Spalten der Tabelle mit den Stoffwechselbedingungen (1) und (3), so zeigt sich, daß sie erfüllt sind. Denn es ist für Fibroblasten:

$$Q_M^{N_2} \approx 48, \quad U = -3,5.$$

Tabelle I.

Fibroblasten aus Deckglaskultur, in Hühnerserum gemessen. Das Serum enthielt etwa 0,25% Glucose und war in bezug auf Bicarbonat $2,5 \cdot 10^{-2}$ bis $3,0 \cdot 10^{-2}$ normal.

Alter der Kultur, die immer 48 Std. nach der Überpflanzung gemessen wurde. Zahl der Über- pflanzungen	Mittleres Gewicht eines Gewebestücks mg	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$	$U = \frac{Q_M^{N_2}}{2 Q_{O_2}}$
1	0,019	-22,6	+7,6	+48,5	+3,3
1	0,015	-22,9	+9	+42	-3,6
1	0,017	-22	+6,6	+38	-5,5
3	0,013	-16,2	+3	+35,4	+3,1
3	0,013	-12	+5,3	+23,6	0
4	0,015	-15	+4,8	+23	-7,3
5	0,019	-10	+4,8	+12,6	-7,2
6	0,017	-11	+7	+17,5	-5,1
8	0,008	-12,5	+4,3	+19,3	-5,7
etwa 3000	0,024	-12	+6	+17	-7,2
					Mittel: -3,5

Als Versuchsobjekte für Stoffwechselmessungen sind Fibroblastenkulturen ungeeigneter als körperfrische, wachsende Gewebe. Obwohl histologisch einheitlicher, sind sie physiologisch ungleichartiger und haben in älteren Kulturen einen Stoffwechsel, der wahrscheinlich niedriger ist, als er im Körper wäre.

Könnte man den Stoffwechsel der Fibroblasten während ihres Wachstums in dem Kulturmedium messen, so würde man voraussichtlich nichts anderes finden als nach Übertragung der Kulturen in Hühnerserum. Der Stoffwechsel eines sich furchenden Seeigeleies ändert sich nicht, wenn man die Furchung durch Narkotica verhindert¹. Für die Fibroblasten ist ein entsprechender Versuch aus methodischen Gründen nicht ausführbar. Schon Wind² hat darauf hingewiesen, daß die Konzentrationen der Stoffe in den Oberflächen der festliegenden Gewebestücke undefiniert und inkonstant sind, z. B. die Konzentration des Sauerstoffs, der Kohlensäure, der Milchsäure, der Glucose. Wird unter solchen Umständen ein Stoff m im Stoffwechsel verbraucht oder gebildet, so ändert sich der Stoffwechsel dm/dt mit der Zeit. Man kann zwar das Integral $\int \frac{dm}{dt} dt$ messen, aber daraus den Stoffwechsel dm/dt nicht berechnen.

¹ O. Warburg, Stoffwechsel der Tumoren, S. 31. Springer 1926; Hoppe-Seyler 66, 305, 1910.

² F. Wind, Stoffwechsel von Gewebeexplantaten, diese Zeitschr. 179, 384, 1926.

2. Epithel.

Für Epithel, das Dr. *Albert Fischer* aus embryonalem Hühnergehirn gezüchtet hatte, fanden wir in Hühnerserum (vgl. Protokoll 2)

$$Q_{O_2} = -24,6, \quad Q_M^{O_2} = +12,5, \quad Q_M^{N_2} = +34, \quad U = -15,$$

also auch hier Übereinstimmung mit den Beziehungen (1) und (3).

3. Embryonale Herzen.

Wir untersuchten embryonale Hühnerherzen in verschiedenen Stadien der Entwicklung und fanden in Hühnerserum (vgl. Protokoll 3)

Bebrütungszeit	Trockengewicht eines Herzens mg	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$	U
4 Tage	0,07	-30	+12,5	+52	-8,1
6 "	0,30	-14,6	0	+25	-4,2
7 "	0,80	-15,1	+3,3	+15	-16

In Abb. 1 ist $Q_M^{N_2}$ als Funktion des Herzgewichts aufgetragen, und man sieht, wie $Q_M^{N_2}$ im Laufe der Entwicklung kleiner wird. Es ist

$$Q_M^{N_2} \approx 52,$$

$$\frac{dQ_M^{N_2}}{dt} < 0.$$

Die Berechnung von U ist hier nicht einwandfrei, weil die Herzen in Sauerstoff schlagen und in Stickstoff nicht schlagen. Berechnen wir U trotzdem, so ist $U < 0$.

Da Herzen histologisch einfacher zusammengesetzt sind als Embryonen, und $Q_M^{N_2}$ größer ist als für Embryonen gleichen Alters, so sind Herzen als Versuchsmaterial ganzen Embryonen vorzuziehen.

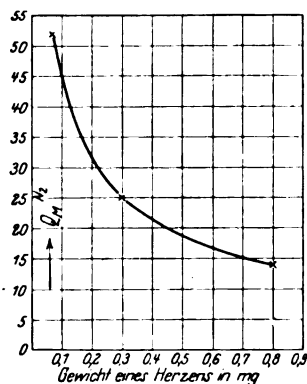


Abb. 1.

4. Chorion.

Noch günstiger als Herz ist Chorion, dessen Glykolyse *E. Negelein*¹ zuerst gemessen hat. Hier fällt die Komplikation der äußeren Arbeitsleistung fort. Chorion ist histologisch einfach gebaut, sehr dünn und kann leicht in physiologisch gleichartigem Zustande beschafft werden.

¹ *E. Negelein*, diese Zeitschr. 165, 122, 1925.

In der Arbeit von *Negelein* fehlt ein vollständiger Stoffwechselversuch für Chorion in Serum. *Negelein* hat diesen Versuch nachgeholt und folgende Werte gefunden (Protokoll 4):

$$Q_{O_2} = -18 \quad Q_M^{O_2} = 0 \quad Q_M^{N_2} = +33 \quad U = -3$$

Es ist also

$$Q_M^{N_2} = 33, \\ U < 0$$

in Übereinstimmung mit (1) und (3). Daß für Chorion auch $\frac{dQ_M^{N_2}}{dt} < 0$ gilt, hat *Negelein* in der zitierten Arbeit schon nachgewiesen.

5. Protokolle.

Protokoll 1.

Fibroblasten in frischem Hühnerserum. 37,8°.

I. Nach einer Umpflanzung. 55 Gewebestücke = 0,84 mg trocken.	II. Nach etwa 3000 Überpflanzungen. 50 Gewebestücke = 1,22 mg trocken.
$\left(\frac{\mathcal{J}u}{\mathcal{J}p}\right)_C = 0,075 \quad B_0 = 477$	$\left(\frac{\mathcal{J}u}{\mathcal{J}p}\right)_C = 0,079 \quad B_0 = 612$
$v_F = 7,0 \quad v_G = 6,92$	$v_F = 1,5 \quad v_G = 2,07$
$K_{O_2} = 0,626 \quad K_{CO_2}^R = 0,987 \quad K_{CO_2}^S = 1,512$ 5 % CO ₂ in O ₂	$K_{O_2} = 0,191 \quad K_{CO_2}^R = 0,268 \quad K_{CO_2}^S = 0,386$ 5 % CO ₂ in O ₂
Nach 15' — 3,5 mm " 15' — 3,0 " ↓	Nach 15' — 3,5 mm " 15' — 6,0 " " 15' — 6,1 " " 15' — 5,0 " ↓
$v_F = 3,0 \quad v_G = 10,92$ $k_{O_2} = 0,097 \quad k_{CO_2}^R = 1,12 \quad k_{CO_2}^S = 1,35$ 5 % CO ₂ in O ₂	$v_F = 0,5 \quad v_G = 3,07$ $k_{O_2} = 0,271 \quad k_{CO_2}^R = 0,297 \quad k_{CO_2}^S = 0,336$ 5 % CO ₂ in O ₂
Nach 15' 0 mm " 15' 0 " ↓	Nach 15' + 3,0 mm " 15' + 2,5 " ↓
$v_F = 3,0 \quad v_G = 10,92$ $\left(\frac{\mathcal{J}u}{\mathcal{J}p}\right)_M = 0,115$ $k_M^S = 1,470$ 5 % CO ₂ in N ₂	$v_F = 0,5 \quad v_G = 3,07$ $\left(\frac{\mathcal{J}u}{\mathcal{J}p}\right)_M = 0,128$ $k_M^S = 0,361$ 5 % CO ₂ in N ₂
Nach 15' + 6 mm " 15' + 6 " " 15' + 6 "	Nach 10' 9 mm " 10' 11 " " 10' 9 "
$Q_{O_2} = -22,9 \quad Q_M^{O_2} = +9$ $Q_M^{N_2} = +42$	$Q_{O_2} = -12,2 \quad Q_M^{O_2} = +5,9$ $Q_M^{N_2} = +17,2$

Protokoll 2.

Epithel (aus embryonalem Hühner-
gehirn) in frischem Hühnerserum.
37,6°.

Gewicht der Gewebestücke 0,55 mg trocken.

$$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_C = 0,078 \quad B_0 = 590$$

$$v_F = 1,5 \quad v_G = 2,07$$

$$K_{O_2} = 0,186 \quad K_{CO_2}^R = 0,263 \quad K_{CO_2}^S = 0,380$$

$$5 \text{ } \% \text{ CO}_2 \text{ in O}_2$$

Nach 15' — 4,5 mm
" 15' — 5,0 "
" 15' — 4,5 "

↓

$$v_F = 0,5 \quad v_G = 3,07$$

$$k_{O_2} = 0,271 \quad k_{CO_2}^R = 0,297 \quad k_{CO_2}^S = 0,336$$

$$5 \text{ } \% \text{ CO}_2 \text{ in O}_2$$

Nach 15' + 3,0 mm
" 15' + 2,5 "

↓

$$v_F = 0,5 \quad v_G = 3,07$$

$$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0,132$$

$$k_M^S = 0,363$$

$$5 \text{ } \% \text{ CO}_2 \text{ in N}_2$$

Nach 30' + 24 mm
" 30' + 28 "

$$Q_{O_2} = -24,6 \quad Q_M^{O_2} = +12,5$$

$$Q_M^{N_2} = +34 \quad U = -15$$

Protokoll 3.

Embryonale Hühnerherzen in
frischem Hühnerserum.
37,8°.

27 Herzen = 1,83 mg trocken.

$$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_C = 0,083 \quad B_0 = 511$$

$$v_F = 7,0 \quad v_G = 6,56$$

$$K_{O_2} = 0,594 \quad K_{CO_2}^R = 0,955 \quad K_{CO_2}^S = 1,538$$

$$5 \text{ } \% \text{ CO}_2 \text{ in O}_2$$

Nach 10' — 6,5 mm
" 10' — 7,5 "
" 10' — 7,0 "

↓

$$v_F = 3,0 \quad v_G = 10,56$$

$$k_{O_2} = 0,936 \quad k_{CO_2}^R = 1,091 \quad k_{CO_2}^S = 1,341$$

$$5 \text{ } \% \text{ CO}_2 \text{ in O}_2$$

Nach 15' — 0,5 mm
" 15' 0 "

↓

$$v_F = 3,0 \quad v_G = 10,56$$

$$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0,116$$

$$k_M^S = 1,439$$

$$5 \text{ } \% \text{ CO}_2 \text{ in N}_2$$

Nach 10' + 11 mm
" 10' + 10,5 "
" 10' + 11,5 "

$$Q_{O_2} = -30 \quad Q_M^{O_2} = +12,5$$

$$Q_M^{N_2} = +51,9$$

Protokoll 4.

Chorion der Ratte in Rattenserum bei 37,5°.

	Frisches Serum. 4 Häute = 8,23 mg. $v_F = 7,0$ $v_G = 6,16$ $K_{O_2} = 0,56$ $K_{CO_2} = 0,92$ $K_{CO_2}^N = 1,66$ 5 % CO_2 in O_2	Serum 30' bei 56° inaktiviert. 3 Häute = 6,43 mg. $v_F = 7,0$ $v_G = 6,10$ $K_{O_2} = 0,55$ $K_{CO_2} = 0,91$ $K_{CO_2}^N = 1,62$ 5 % CO_2 in O_2
Nach 10'	— 30,0 mm	— 26,5 mm
„ 10'	— 29,5 „	— 26,0 „
	$v_F = 3,0$ $v_G = 10,16$ $k_{O_2} = 0,90$ $k_{CO_2} = 1,05$ $k_{CO_2}^N = 1,37$ 5 % CO_2 in O_2	$v_F = 3,0$ $v_G = 10,10$ $k_{O_2} = 0,89$ $k_{CO_2} = 1,05$ $k_{CO_2}^N = 1,35$ 5 % CO_2 in O_2
Nach 10'	— 10,0 mm	— 9,0 mm
„ 10'	— 10,0 „	— 9,0 „
	$k_M^S = 1,57$ 5 % CO_2 in N_2	$k_M^S = 1,55$ 5 % CO_2 in N_2
Nach 10'	+ 29 mm	+ 24 mm
„ 10'	+ 28 „	+ 23 „
	$Q_{O_2} = -18$ $Q_M^{O_2} = 0$ $Q_M^{N_2} = +33$ $U = -3$	$Q_{O_2} = -19,8$ $Q_M^{O_2} = 0$ $Q_M^{N_2} = +34$ $U = -5,6$

Beiträge zur Frage der fermentativen Eiweißsynthese¹.

Von

P. Rona und Fr. Chrometzka.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität
Berlin.)

(Eingegangen am 15. Juli 1927.)

Die Frage der fermentativen Eiweißsynthese ist bereits von mehreren Forschern bearbeitet worden. Auf Grund der Arbeiten von *Henriques* und *Gjaldbæk* (1911) und in neuerer Zeit durch die Untersuchungen von *Wasteneys* und *Borsook* ist die Ansicht vorherrschend, daß die durch Pepsin und Trypsin katalysierte Eiweißverdauung eine reversible Reaktion ist, d. h. daß unter bestimmten Bedingungen Pepsin wie Trypsin auch synthetisieren (den chemischen Umsatz nach der Richtung der Synthese katalysieren) können. Diese Annahme gewann durch die Untersuchungen von *Henriques* und *Gjaldbæk* dadurch eine Stütze, daß es ihnen gelang, den bei diesem Vorgang zu erwartenden Schwund von freien NH_2 -Gruppen nachzuweisen. Andere Autoren auf diesem Gebiete nehmen als Kriterium der Synthese das Entstehen von schwer löslichen Produkten aus vorher leichter löslichen Abbauprodukten an. Eine exakte Analyse der sogenannten Plasteine (der synthetischen Eiweißprodukte) war und ist (mit gewissen Einschränkungen) auch heute noch bei unserer Unkenntnis über den Eiweißaufbau fast unmöglich. In der Charakterisierung dieser Plasteine liegt aber der Angelpunkt der ganzen Synthesefrage. Wir stellten uns die Aufgabe, diesen Prozeß der Synthese mit Methoden zu analysieren, die uns die neueste Fermentforschung der *Willstätterschen* Schule an

¹ Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft.

die Hand gibt. Wir sind dabei zu einem Resultat gekommen, das mit der Ansicht von *Borsook* und *Wasteneys* über diesen Vorgang in Widerspruch steht, wenn auch ihre experimentellen Befunde bestätigt werden konnten.

Wasteneys und *Borsook* gingen bei der Charakterisierung ihrer Produkte so vor, daß sie die Größe des Quotienten Amino-N : Gesamt-N maßgebend für die molekulare Einordnung der Eiweißabbauprodukte ansetzten. Ein hochmolekularer Eiweißkörper mit zahlreichen CO—NH-Bindungen, also hohem N-Gehalt, bei geringer Zahl freier COOH- und NH₂-Gruppen würde einen möglichst niedrigen Quotienten enthalten. Je niedriger eine molekulare Abbaustufe ist, desto mehr sinkt die Gesamt-N-Zahl zugunsten der freien NH₂-Werte, desto größer wird also der Quotient Amino-N : Gesamt-N. Dies gilt indes natürlich nur für Abbauprodukte eines und desselben Eiweißes, denn natives Casein z. B. hat einen Quotienten, der 11,9 entspricht, während die Proteosen des Albumins (Körper, die zwischen den natürlichen Proteinen und Peptonen stehen) einen solchen von 10,5 zeigen. Wesentliche Bedeutung messen die Autoren dem Löslichkeitsverhalten der Eiweißabbauprodukte zu. Tieferer molekularer Bau und stärkere Löslichkeit sollten stets parallel gehen. So bezeichnen *Wasteneys* und *Borsook* vielfach die in ihren Reagensglasversuchen erhaltenen N-haltigen Niederschläge als Plasteine.

Es kann jedoch leicht beobachtet werden, daß bei der peptischen Verdauung des Caseins allmählich eine starke Flockung statthat, die aus abgebauten und trotzdem schwerer löslichen Produkten besteht¹. Im Laufe unserer Untersuchungen hatten wir Gelegenheit, diese Beobachtung auch auf Ovalbumin und Serumalbumin auszudehnen. Gerade an diesen Substraten ist das Phänomen auffällig, weil erst in späten Stadien der Verdauung diese schwerer wasserlöslichen Verbindungen entstehen; es müssen offenbar recht tief abgebaute Produkte sein. Aussichtsreicher gestaltet sich daher die Prüfung der Frage einer (anscheinenden) Synthese, wenn die Änderung im Verhalten der freien COOH- und der freien NH₂-Gruppen gleichzeitig untersucht wird. Diese Versuche sollen zunächst in nachfolgendem geschildert werden.

1. Ausgangsmaterial.

a) Ovalbumin.

Bei der Beschaffung des Ausgangsmaterials lehnten wir uns eng an die von *Wasteneys* und *Borsook* im Journ. of Biolog. Chem. 1924 mitgeteilten Vorschriften an. Wir stellten uns aus Ovalbumin *Kahlbaum* und später

¹ Vgl. hierzu namentlich *H. H. Weber* und *H. Gesenius*, diese Zeitschr. 187, 410, 1927.

Merck 6%ige Lösungen her, stellten sie auf ein für das Pepsin geeignetes p_H ein (s. Tabelle VIII) und ließen sie wochenlang unter steter Kontrolle des Verdauungsgrades und des Milieus hydrolysieren. Als Puffer wählten wir Phosphat¹. Am Schluß des von uns gewählten Zeitpunkts zeigte keines der Substrate Fällungsreaktionen mit Trichloressigsäure mehr. In Tabelle VIII (S. 263) ist der Ablauf der Verdauung zu ersehen.

b) Serumalbumin.

Mehrere Liter Pferdeserum wurden mit der gleichen Menge gesättigten Ammonsulfats von den Globulinen befreit. Das Filtrat wurde 8 bis 10 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert (*Schleicher-Schüll-Membran*). Die so erhaltene sehr verdünnte Albuminlösung enthielt kein Ammonsulfat mehr, war vollständig klar und wurde im Vakuum bei einer Temperatur, die 37° C nicht überschritt, auf eine 6%ige Lösung konzentriert. Auch diese Lösung wurde mit Phosphat stark gepuffert bei einem optimalen p_H durch Pepsin hydrolysiert.

c) Casein.

Wir verdanken die freundliche Überlassung der durch Pepsin weit abgebauten Caseinlösungen (Casein *Hammarsten*, Pepsin *Ph. Brit*) Herrn Dr. *Gesenius*². Auch diese Lösung zeigte keinerlei Fällbarkeit mit Trichloressigsäure.

2. Syntheseversuche.

a) Pepsin-„Synthese“.

a) Ovalbumin. (Tabelle I.)

Wasteneys und *Borsock* untersuchten eingehend die Bedingungen, unter denen die Ausbeute an wasserunlöslichen Produkten, also die „Synthese“ am größten war, und fanden das Optimum der synthetisierenden Funktion des Pepsins bei p_H 4 bis 5 bei der Verwendung möglichst hoch konzentrierter Lösungen von Eiweißabbaustufen. Die sehr eingehend studierten Bedingungen sind in ihren Arbeiten nachzulesen³. Unsere Fragestellung lautete: Können wir in Anlehnung an die in den zitierten Arbeiten gegebenen Bedingungen dasselbe

¹ Beispiel einer Ovalbuminpufferung: Lösung F: 12 g Ovalbumin (*Merck*) werden in Wasser unter tropfenweisem Zusatz von n NaOH möglichst gelöst. Danach wird mit Salzsäure neutralisiert und mit 40 ccm eines Phosphatpuffers gepuffert, der auf 100 ccm m H_3PO_4 16 ccm n NaOH enthält. Die Lösung wird dann auf 400 ccm mit Wasser aufgefüllt, mit Pepsin versetzt und unter Toluol zur Verdauung angesetzt.

Beispiel einer Serumalbuminpufferung: Lösung D: 300 ccm der 6%igen Serumalbuminlösung werden mit 102 ccm des beim Ovalbumin beschriebenen phosphorsäureprimären Phosphatpuffers versetzt. Nach Messung des p_H wird mit Pepsin unter Toluolzusatz verdaut.

² Über die Herstellung vgl. *H. Weber* und *H. Gesenius* l. c.

³ *Wasteneys* und *Borsock*, Journ. of Biol. Chem. **62**, 15, 1924/25; *Borsock* und *Wasteneys*, ebendasselbst **62**, 633, 1924/25; **63**, 563, 1925.

Tabelle I

1	2	3	4	5	6	7	8
Nr. der Versuchsserie	Ansatz	pH	Ges.-N* g-%	Rest-N (CCl ₃ COOH) g-%	Rest-N (Hofmeister) g-%	Willstätter ccm n KOH	von Syz. g-% Amino
2	A	4,0	4,410	4,334	4,354	165,0	0,848
2	B	4,0	4,214	3,729	4,004	158,0	0,7375
2	C	4,0	4,200	3,192	3,654	156,0	0,6915
2	D	4,0	4,140	3,898	3,864	160,0	0,6832
3	A	4,0	3,842	3,830	3,840	110,0	0,706
3	B	4,0	3,710	2,920	3,290	106,0	0,606
3	C	4,0	3,710	2,960	3,360	106,0	0,570
5	A	4,23	5,418	5,180	5,265	179,0	1,098
5	B	4,23	5,012	3,822	4,718	166,0	0,827
9	A	4,23	4,640	4,600	4,640	168,0	1,030
9	B	4,23	4,651	3,458	4,088	168,0	0,851
10	A	5,54	4,102	4,032	—	122,0	0,961
10	D	5,54	4,000	3,562	—	123,0	0,800
11	A	5,52	3,950	3,900	—	157,3	0,9063
11	B	5,52	3,990	3,600	—	156,2	0,763
13	A	4,1	5,964	5,960	—	244,0	1,364
13	B ₁	4,1	5,894	4,637	—	242,0	1,126
13	B ₂	4,1	6,104	4,838	—	245,0	1,090
14	A	1,87	6,356	6,354	—	400,0	1,446
14	B	1,87	5,432	5,420	—	350,0	1,253

* Anmerkung zu Tabelle I. Alle Zahlen der Ansätze B, C, D müssen mit einem Faktor (z. B. in den Ansatz A bezogen werden können.

** Bemerkung zur Hofmeister-Enteweißung durch Kochen. 5 ccm der, wie beschrieben, verd. Elektrolyte werden etwa 2 g NaCl zugesetzt. Man stellt die so in einen Kjeldahlkolben eingebracht direkt in einen Kjeldahlkolben filtriert und das Filter mit 1%iger Monokaliumphosphatlösung gewaschen.

9		10		11
Änderung der COOH- bzw. NH ₂ -Mengen in ccm n 0/0		g 0/0 des Fällbaren durch		Anordnung der Ansätze
n COOH ccm	n NH ₂ ccm	Trichlor-essigsäure	Kochen **	
—	—	1,7	1,3	A: Sofort nach Umstellung auf $p_H = 4,0$ analysiert B: Umstellg. auf $p_H = 4,0$ ohne weit. Zus. 48 Std. i. Thermost. C: Umstellg. auf $p_H = 4,0$. Zus. v. 10 0/0 Pepsin. 48 Std. im Thermostaten. D: Umstellg. auf $p_H = 4,0$. Aufkochen nach Zus. von 10 0/0 Pepsin. 48 Std. i. Thermost.
+ 0,4	— 5,4	11,5	5,0	
— 1,0	— 8,6	24,0	13,0	
+ 5,3	— 8,63	5,8	6,6	
—	—	0,0	0,0	A: Umstellg. auf $p_H = 4,0$. Sof. analysiert B: Umstellg. auf $p_H = 4,0$ Zus. v. 10 0/0 Pepsin. 48 Std. im Thermostaten C: Umstellg. auf $p_H = 4,0$. Aufkochen. Zus. v. 10 0/0 Pepsin. 48 Std. im Thermostaten.
± 0,0	— 5,4	21,3	11,3	
± 0,0	— 8,0	20,0	9,5	
—	—	4,5	2,9	A: Umstellg. auf $p_H = 4,23$. Sof. analysiert B: Umstellg. auf $p_H = 4,23$. Zusatz v. 10 0/0 Pepsin. 48 Std. im Thermostaten
± 0,0	— 14,0	23,8	5,9	
—	—	0,80	0,0	A: Umstellg. auf $p_H = 4,23$. Sof. analysiert B: Umstellg. auf $p_H = 4,23$. Zus. v. 10 0/0 Peps. 48 Std. i. Therm.
± 0,0	— 13,8	25,7	12,1	
—	—	1,70	—	A: Umstellg. auf $p_H = 5,54$. Sof. analysiert. D: Umstellung auf $p_H = 5,54$. Zusatz von 10 0/0 Pepsin. 48 Std. im Thermostaten
+ 1,0	— 11,4	11,00	—	
—	—	0,0	—	A: Umstellung auf $p_H = 5,52$. Sofort analysiert B: Umstellung auf $p_H = 5,52$. Zus. v. 10 0/0 Pepsin. 48 Std. im Thermostaten
— 1,0	— 10,0	9,8	—	
—	—	0,0	—	A: Umstellg. auf $p_H = 4,1$. Sof. analysiert B ₁ : } Umstellung auf $p_H = 4,1$. Zus. v. 10 0/0 Pepsin. 48 Std. B ₂ : } im Thermostaten bei 40°
— 2,0	— 17,0	21,4	—	
+ 1,0	— 19,2	20,8	—	
—	—	0,0	—	A: Einstellung auf $p_H = 1,87$. Sofort analysiert B: Einstellung auf $p_H = 1,87$. Zus. v. 10 0/0 Pepsin. 48 Std. im Thermostaten
+ 9,5	+ 1,4	Spuren	—	

1,047, 1,052, 1,065) multipliziert werden, damit sie wegen der Verschiedenheit des Gesamt-N-Gehaltes auf Nitze werden mit 50 ccm einer 2 0/0 igen Monokaliumphosphatlösung versetzt. Zur Vermehrung der einem Steigrohr versehenen Analysen für 1/2 Std. in ein kochendes Wasserbad. Danach wird abgekühlt, filtriert wie bekannt, der N bestimmt.

Resultat erhalten und wie verhalten sich die COOH- und NH₂-Gruppen vor und nach Ablauf der Reaktion?

Zur Darstellung der konzentrierten Eiweißabbauprodukte wurden die wie oben beschriebenen, durch Pepsin völlig verdauten Ovalbuminlösungen unter vermindertem Druck im Kolben bei 37° C eingengt. Die völlig klaren, gelbbraun gefärbten, zähflüssigen Lösungen wurden — wie aus der Tabelle I zu ersehen ist — auf das für die einzelnen Ansätze benötigte p_H gebracht. Wir bedienten uns zu dieser Umstellung gewöhnlich der Glockenelektrode.

Nach der Einstellung des im Einzelfalle aus der Tabelle I abzulesenden p_H wurden je 5 ccm der stark viskosen, klaren Lösung in verschiedene Reagenzgläser gebracht. Zu den für den Syntheseversuch bestimmten Ansätzen (gewöhnlich 5 ccm) wurden 0,5 g (oder eine andere aus der Tabelle zu ersehene Menge) Pepsin *Merck* zugefügt. Nach Zusatz von Toluol wurden die Gläser verkorkt und in den Thermostaten (37 bis 40° C) für 48 Stunden verbracht. Der A-Wert (s. Tabelle) wurde sofort analysiert. Nach Ablauf der Pepsinwirkung in den „Synthese“-Ansätzen wurden diese ebenso behandelt.

Bemerkungen zur Aufarbeitung der Ansätze. Als Ausgangssubstrat (Ansatz A) dienten die eingedickten, auf den in den einzelnen Tabellen angegebenen p_H gebrachten peptischen Verdauungsprodukte. 5 ccm des Substrats wurden in einen 25-ccm-Kolben pipettiert, bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt, dann je 5 ccm zur Analyse des Gesamt-N, des Rest-N, der Willstättertitation verwandt; in den Versuchen 9, 11, und 13 ebenfalls 5 ccm zur Ammoniakbestimmung. Die Ansätze B, C usw., zu denen auch stets 5 ccm der eingengten Lösung der peptischen Verdauungsprodukte verwandt wurden (Pepsin bzw. Trypsin wurde nach Angabe von *Wasteneys* und *Borsook* in die 5 ccm hineingerührt), waren nach dem Versuch nicht mehr homogen; sie stellten Suspensionen dar. Es wäre möglich gewesen, durch Alkali die suspendierte Phase zu lösen. Wir zogen aber vor, die Suspension als solche zu analysieren, d. h. wir schüttelten kräftig um und pipettierten rasch je 5 ccm unter fortgesetztem Schütteln für die einzelnen Analysen ab.

Aus zwölf Versuchen geht hervor, daß in Übereinstimmung mit den Angaben von *Wasteneys* und *Borsook* durch die Wirkung von Pepsin auf konzentrierte klarwasserlösliche Eiweißabbauprodukte des Ovalbumins schwerlösliche Verbindungen ausgefällt werden. Die Trichloressigsäurefällbarkeit nimmt sehr stark zu. p_H 4 bis 5,5 sind optimale Gebiete für diese Reaktion. Wie Versuch 14 zeigt, findet bei einem p_H von 1,8 keinerlei Vermehrung der mit Trichloressigsäure fällbaren Substanzen statt. Die Menge der wasserunlöslichen und der mit Trichloressigsäure fällbaren Substanzen gehen nicht parallel, stets bilden die wasserunlöslichen Produkte nur einen Teil der mit Trichloressigsäure ausgefallenen Substanzen.

Das Bemerkenswerteste in der Tabelle ist das Verhalten der COOH- und NH₂-Gruppen. In Kolumne 9 sind die Veränderungen der COOH- und NH₂-Mengen angegeben. Dabei bedeutet ein + einen Zuwachs, ein — eine Abnahme der besagten Gruppen in den B C, D usw. -An-

Proto- koll.-Nr.	Ansatz	pH	Ges.-N g-%	Rest-N (Trichlor- essigsäure) g-%	Rest-N (Hofmeister) g-%	Wollfälliger ccm n KOH	von Styke g-% Amino-N	Änder. d. COOH- bzw. NH ₂ -Mengen im ccm n %			g-% des Fällbaren durch		Anordnung der Ansätze
								n COOH	n NH ₂		Trichlor- essigsäure	Kochen	
1	A	4,1	4,27	4,27	—	—	—	—	—	0,0	—	A : Umstell. auf pH = 4,1. So- fort analysiert	
1	B	4,1	4,34	3,92	—	—	—	—	—	9,7	—	B : Umstell. auf pH = 4,1. Zu- satz von 1 % Pepsin. 48 Std. im Thermostaten	
1	C	4,1	4,48	3,64	—	—	—	—	—	19,0	—	C : Umstell. auf pH = 4,1. Zu- satz von 10 % Pepsin. 48 Std. im Thermostaten	
4	A	5,4	1,764	1,680	1,630	—	—	—	—	5,0	7,6	A : Umstell. auf pH = 5,4. So- fort analysiert	
4	B	5,4	1,708	1,080	1,281	—	—	—	—	36,8	25,0	B : Umstell. auf pH = 5,4. Zu- satz von 10 % Pepsin. 48 Std. im Thermostaten	
12	A	4,0	2,640	2,595	—	206,0	0,804	—	—	2,0	—	A : Umstell. auf pH = 4. Sofort analysiert	
12	B	4,0	2,650	2,318	—	206,0	0,644	0,0	-11,5	12,6	—	B ₁ : Umstell. auf pH = 4. Zusatz v. 10 % Pepsin. 48 Std. bei 40°	
12	C	4,0	2,690	2,290	—	206,0	0,650	0,0	-11,0	15,0	—	B ₂ : Umstell. auf pH = 4. Zusatz v. 10 % Pepsin. 48 Std. bei 40°	

Tabelle III.

Proto- koll.-Nr.	Ansatz	pH	Ges.-N. g-%	Rest-N (Trichlor- essigsäure) g-%	Wollfälliger ccm n KOH	von Styke g-% Amino-N	Veränderungen der COOH- bzw. NH ₂ -Mengen im ccm n o/o			Menge des mit Trichloressig- säure Fällbaren g-%	Anordnung des Ansatzes
							n COOH	n NH ₂			
6	A	4,23	5,364	5,205	150,0	1,4013	—	—	3,0	A : Umgestellt auf pH = 4,23. Sofort analysiert	
6	B	4,23	4,986	4,808	146,6	1,354	+ 6	+ 3	3,6	B : Umgestellt auf pH = 4,23. Zusatz von 10 o/o Pepsin. 48 Std. bei 37°	
8	A	4,84	5,139	5,040	141,0	1,614	—	—	2,0	A : Umgestellt auf pH = 4,84. Sofort analysiert	
8	B	4,84	5,110	5,000	140,0	1,572	— 1,0	— 0,3	2,2	B : Umgestellt auf pH = 4,84. Zusatz von 10 o/o Pepsin. 48 Std. bei 37°	

sätzen gegenüber dem A-Werte. In 12 Versuchen zeigt sich, daß bei dem Vorgang der Synthese die COOH-Gruppen praktisch völlig gleich bleiben. Durchgehend zeigt sich dagegen eine erhebliche Abnahme der NH₂-Gruppen. Die Größe der Fällbarkeit mit Trichloressigsäure geht in großen Zügen parallel mit der Menge der verschwundenen NH₂-Gruppen.

b) Serumalbumin. (Tabelle II.)

Das peptische Serumalbuminabbaugemisch (Darstellung siehe oben) wurde, wie beim Ovalbumin beschrieben, erheblich eingengt. Die Lösungen waren ebenfalls klar, aber weitaus dunkler gefärbt als die gleichbehandelten Ovalbuminlösungen. Bei der dann angestellten Umstellung auf einen für die Synthese geeigneten p_H traten stets geringe Fällungserscheinungen auf.

Die Versuchsbedingungen wurden völlig analog dem bei den Ovalbuminversuchen beschriebenen Verfahren gewählt. Desgleichen gestaltete sich die Aufarbeitung der Versuche und ihre tabellarische Aufzeichnung in der oben gegebenen Weise.

Auch hier konnten wir — wie aus der Tabelle II zu ersehen ist — dartun, daß eine „Synthese“ (im Sinne von *Borsook* und *Wasteneys*) statthat. Die Menge der mit Trichloressigsäure fällbaren Substanzen erreicht ähnliche Grade wie die beim Ovalbumin. Das Verhalten der COOH- und NH₂-Gruppen war auch dem beim Ovalbumin entsprechend.

c) Casein. (Tabelle III.)

In Anbetracht der besonderen Stellung, die das Casein unter den nativen Eiweißkörpern einnimmt, war es interessant zu untersuchen, ob auch dieses Substrat zur Synthese geeignet sei, da ja *Wasteneys* und *Borsook* an dem Beispiel der Gelatine zeigten, daß die Fähigkeit zur Synthese nicht allen Eiweißklassen zukommt. Die Gewinnung der eingengten Produkte des Caseinabbaues geschah in derselben Anordnung wie unter a) und b). Ebenso gestaltete sich die Aufarbeitung der einzelnen Ansätze.

Es findet keinerlei Veränderung des Substrats im Sinne einer größeren Fällbarkeit durch Trichloressigsäure nach dem Einwirken des Pepsins bei p_H 4,2 und 4,8 statt. Wirft man einen Blick auf die COOH- und NH₂-Gruppen (Tabelle III, Kolonne 8), so ergibt sich die Tatsache, daß die Menge derselben entweder gleich geblieben oder ein wenig zugenommen hat.

β) Trypsin. (Tabelle IV.)

Nach den Angaben von *Wasteneys* und *Borsook* beschränkt sich die synthetisierende Eigenschaft der Proteasen nicht nur auf das Pepsin, vielmehr auch das Trypsin ist imstande, aus peptischen Eiweißabbauprodukten Plastein zu resynthetisieren.

Tabelle IV.

Lfd. Protok. Nr.	Ansatz	pH	Ges.-N. g-%	Rest-N (Trichlor- essigsäure) g-%	Wisslütler ccm N KOH	van Slyke g-% Amino-N	Veränderung der COOH, bzw. NH ₂ Mengen im n ccm %		Menge des mit Trichlor- essigsäure Fällbaren g-%	Anordnung des Ansatzes
							n COOH	n NH ₂		
10	A	5,54	4,102	4,032	122,0	0,961	—	—	1,7	A: Umgestellt auf pH = 5,54. Sofort analysiert.
10	E	5,54	5,300	4,166	184,0	1,808	+ 14,0	+ 12,0	21,4	E: Umgestellt auf pH = 5,54. Zusatz von 10% Pankreatin Rhenania. 48 Std. bei 40°.
11	A	5,52	3,950	3,900	157,3	0,9065	—	—	Spuren	A: Umgestellt auf pH = 5,52. Sofort analysiert.
11	C	5,52	4,872	4,099	214,5	1,690	+ 9,0	+ 8,0	15,9	C: Umgestellt auf pH = 5,52. Zusatz von 10% Pankreatin Rhenania. 48 Std. bei 40°.
13	C	9,5	4,256	4,250	44,0	0,930	—	—	0,0	C: Umgestellt auf pH = 9,50. Sofort analysiert.
13	D	9,5	4,750	4,636	136,0	1,7322	+ 44,0	+ 9,2	0,0	D: Umgestellt auf pH = 9,50. Zusatz von 10% Pankreatin Rhenania. 48 Std. bei 40°.
15	A	8,0	4,256	4,250	44,0	0,930	—	—	Spuren	A: Siehe Ansatz 13 A. Sofort analysiert.
15	B	8,0	5,964	5,628	138,0	1,943	+ 50,0	+ 50,55	7,0	B: Umgestellt auf pH = 8,00. Zusatz von 10% Pankreatin Rhenania. 48 Std. bei 40°.
12	A	4,0	2,640	2,595	206,0	0,804	—	—	2,0	A: Umgestellt auf pH = 4,00. Sofort analysiert.
12	C	4,0	3,640	3,125	268,0	1,628	+ 14,0	+ 11,0	14,2	C: Umgestellt auf pH = 4,00. Zusatz von 10% Pankreatin Rhenania. 48 Std. bei 40°.
Pr. Rh.	A	5,38	1,064	0,672	32,5	0,420	32,5	30,0	37,0	Erläuterung siehe im Text.
	B	5,38	1,064	0,907	48,5	0,665	48,5	47,0	15,0	10 g Pankreatin Rhenania Selbst- verdauung in 48 Std. bei 40°.

Wir prüften diese Angaben nach, indem wir auf konzentrierte peptische Verdauungsprodukte des Ovalbumins Pankreatin Rhenania einwirken ließen¹.

Sowohl Ovalbumin wie Serumalbumin werden durch Pankreatin Rhenania weitergespalten. Bei p_H 5,5 (Ansatz 10 und 11) ergibt sich das von *Borsook* und *Wasteneys* beobachtete Phänomen des Auftretens von Körpern, die mit Trichloressigsäure fällbar sind. Bei p_H 8 geschieht dies in erheblich geringerem Maße, bei p_H 9,5 nicht mehr. Beachtet man die $COOH$ - und NH_2 -Werte, so findet man gegenüber den in Tabelle I und II erhobenen Befunden ein ganz anderes Verhalten. Stets finden wir eine Zunahme sowohl der NH_2 - wie $COOH$ -Gruppen.

In Ansatz 13 muß offensichtlich eine Abspaltung von NH_3 stattgefunden haben, was wohl auf die große Alkalität des Ansatzes zurückzuführen ist. Die Spaltung verläuft sonst nach dem Typus $COOH : NH_2$ wie 1 : 1.

Die weiteren Versuche beschäftigten sich mit der Frage über die Einwirkung des Kochens auf die Eiweißabbauprodukte und die Wirkung des Pepsins auf die gekochten Substrate. Dies wurde an Ovalbumin- und Serumalbuminabbauprodukten geprüft. (Tabelle V.)

In der üblichen Anordnung wurden 5 ccm des auf den beabsichtigten p_H eingestellten und eingeeengten Substrats einmal sofort analysiert (A), zweitens wird der Normalansatz (ungekocht) mit 10 % Pepsin angesetzt (2 C, 4 B, 5 B, 9 B). Die Hauptansätze dieser Tabelle lassen sich in zwei Gruppen teilen, die einen werden $\frac{1}{4}$ Stunde im siedendem Wasserbad gehalten vor dem Zusatz von Pepsin (2 E, 4 C, 5 C₂), die anderen nach Zusatz von Pepsin (2 D, 3 D, 5 C₁, 9 C₂).

Durch die Prozedur des Kochens der Eiweißabbauprodukte in konzentrierten Lösungen findet regelmäßig eine Vermehrung der $COOH$ - und NH_2 -Gruppen statt. Aber der Eingriff geht noch weiter: Das freigemachte NH_3 wird abgespalten. So erklärt sich der Verlust

¹ Das Produkt stellt ein voluminöses, schwach gelbliches Pulver dar. Es enthält noch eine Menge mit Trichloressigsäure fällbarer Substanzen. Daneben finden sich beträchtliche Mengen von freien $COOH$ - und NH_2 -Gruppen. Läßt man nun diesen Fermentkomplex bei einem p_H von 5,38 (wie wir ihn bei unseren Ansätzen brauchten) für 48 Stunden im Thermostaten stehen, so zeigt sich, daß die Zahl der $COOH$ - und NH_2 -Gruppen erheblich zu-, die Menge der mit Trichloressigsäure fällbaren Körper dagegen abnimmt. Es ist deshalb notwendig, diese $COOH$ - und NH_2 -Werte, die pro Ansatz einen Leerwert von 48 ccm n $COOH$ und NH_2 ausmachen, von den in den Vollansätzen erhaltenen Zahlen abzuziehen. Die diesbezüglichen Zahlen sind in Tabelle IV unter der Chiffre: Pr. Rh., aufgeführt. Die Konzentration an Ferment ist dieselbe wie in den Ansätzen derselben Tabelle. Anordnung der Versuche und Ausführung der Analysen analog den Angaben unter dem Kapitel Ovalbumin.

Tabelle V.

Versuch	Ansatz	pH	Ges.-N g-%	Rest.-N (Trichlor- essigsäure) g-%	Rest.-N (Hofmeister) g-%	Willstätter ccm n KOH	van Slyke g-% N	Änderungen des COOH bzw. NH_2 -Mengen im ccm n %		Menge des m. Trichlor- essigsäure Fällbaren in g-%	Bemerkungen
								n COOH	n NH_2		
2	A	4,0	4,41	4,334	4,354	165,0	0,848	—	—	1,7	A: $pH = 4,0$. Sofort analysiert
2	C	4,0	4,20	3,192	3,654	156,0	0,6915	- 1,0	- 8,3	24,0	C: $pH = 4,0$. 10 % Pepsin- satz, normaler Ansatz
2	D	4,0	4,156	3,965	3,965	158,0	0,748	+ 2,6	- 3,63	4,6	D: $pH = 4,0$. 10 % Pepsin, dann gekocht u. b. 40° 48 Std. im Thermostaten
2	E	4,0	4,140	3,898	3,864	160,0	0,683	+ 6,2	- 8,4	5,8	E: $pH = 4,0$ gekocht und dann Zusatz 0,10 % Pepsin. 48 Std. bei 40° im Thermostaten
3	A	4,0	3,842	3,83	3,84	110,0	0,7056	—	—	0,0	A: $pH = 4,0$. Sofort analysiert
3	D	4,0	3,640	3,55	3,59	108,0	0,6273	+ 3,8	- 3,1	2,5	D: $pH = 4,0$. Zusatz v. 10 % Pepsin u. dann gekocht. 48 Std. im Thermostaten
4	B	5,4	1,708	1,080	1,281	—	—	—	—	36,8	B: Normales Serum + Albumin- Ansatz, erhebliche „Synthese“
4	C	5,4	1,708	1,200	1,540	—	—	—	—	29,4	C: Nach dem Kochen des Sub- strates Ansatz mit Pepsin, Re- tardierung
5	A	4,23	5,418	5,180	5,265	179,0	1,089	—	—	4,5	A: Ausgangssubstrat. $pH = 4,0$. Sofort analysiert
5	B	4,23	5,012	3,822	4,718	166,0	0,827	0,0	- 14,0	23,8	B: Normalansatz + 10 % Pepsin. 48 Std. im Thermostaten
5	C ₁	4,23	4,585	—	—	164,0	0,7917	+ 14,5	- 11,0	—	C ₁ + 10 % Pepsin $\frac{1}{4}$ Std. ge- kocht (Wasserbad). Sofort ana- lysiert
5	C ₂	4,23	5,152	4,570	5,012	180,0	0,855	+ 10,0	- 13,6	11,9	C ₂ : $\frac{1}{4}$ Std. gekocht, Zusatz 0,10 % Pepsin. 48 Std. b. 40°
9	A	4,23	4,64	4,60	4,64	168,0	1,030	—	—	0,8	A: Ausgangssubstrat $pH = 4,23$. Sofort analysiert
9	B	4,23	4,65	3,458	4,088	168,0	0,851	0,0	- 12,8	25,7	B: Normalansatz + 10 % Pepsin. 48 Std. b. 40°
9	C ₁	4,23	4,662	4,48	—	169,0	0,9124	+ 1,0	- 8,4	3,9	C ₁ : Ohne Zusatz gekocht und sofort analysiert
9	C ₂	4,23	4,651	4,42	4,438	174,0	0,8479	+ 6,0	- 12,9	5,3	C ₂ + 10 % Pepsin, dann gekocht und 48 Std. b. 40° im Therm.

an Aminogruppen. In dem zuletzt angeführten Versuch 9 C₂ wurde eine Ammoniakbestimmung angeschlossen. Es ergaben sich 182,5 mg verschwundener NH₃-N und 104,9 mg NH₃-N, ein Resultat, das, wenn auch die Schwierigkeit der Ammoniakbestimmung zur Vorsicht mahnt, doch erheblich ins Gewicht fällt. Daraus ergibt sich, daß bei der Verfolgung des Verhaltens der COOH- und NH₂-Werte in den Synthesversuchen eine aufgekochte Kontrolle nicht verwertet werden kann. Die „Synthese“ am gekochten Substrat ist erheblich gehemmt. Zum Vergleich sind in der Tabelle die nicht gekochten, sonst gleich ausgeführten Ansätze aufgezeichnet (2 C, 5 B, 9 B).

Was den Einfluß der Temperatur auf die Synthese anlangt, fassen *Borsook* und *Wasteneys* die Ergebnisse ihrer dahinzielenden Untersuchungen in einer Kurve zusammen, die in Form einer Parabel von 10 bis 40 steil ansteigt (Abszisse die Temperaturen, Ordinate der mit Trichloressigsäure fällbare Teil in Prozenten des Gesamtstickstoffs), von 40 bis 65 sich der horizontalen Richtung nähert.

Wir stellten zwei Ansätze an, mit eingengtem Ovalbumin als Substrat und den Temperaturen von 55 und 65°.

Tabelle VI.

Lfd. Proto- koll.-Nr.	Ansatz	p _H	Ges.-N g ^o /o	Rest-N (Trichlor) g ^o /o	Will- stätter ccm n KOH	van Slyke g ^o /o Amino-N	Veränderung der COOH- u. NH ₂ - Menge in ccm		Trichlor- essigsäure- fällung g ^o /o
							n COOH	n NH ₂	
16	A	4,0	5,964	5,960	244,0	1,364	—	—	0,0
	B	4,0	5,960	4,840	250,0	0,924	+ 6,0	- 31,4	19,0
	C	4,0	6,104	4,832	250,0	1,116	+ 1,0	- 19,6	20,8
16	D	4,0	2,73	2,73	6,25	0,6035	—	—	0,0
	E	4,0	2,80	2,58	6,45	0,5843	+ 0,1	- 1,4	7,6

Anordnung der Ansätze. A: Ausgangssubstrat. p_H 4. Sofort analysiert. — B: Zunächst 24 Std. bei 40°, dann 24 Std. bei 50° C. 10 % Pepsinzusatz. — C: Ansatz wie B, aber ohne Erhöhung der Temperatur. — D: Ausgangssubstrat. p_H 4. Sofort analysiert. — E: 10 Std. bei 55° nach Zusatz von 0,35 g Pepsin = 7 %.

16 A: wird sofort nach Umstellung auf p_H 4,0 analysiert.

16 B und C: die Ansätze wurden zunächst 24 Stunden mit 0,5 ccm Pepsin in den Thermostaten von 40° gestellt. 16 C wird weiter darin belassen, 16 C wird in den Thermostaten von 65° gestellt auf 12 Stunden. Nach dieser Zeit werden B und C analysiert.

Wie aus der Tabelle VI sichtlich ist, konnten wir in unseren Ansätzen eine Beschleunigung der Synthese bei Erhöhung der Temperatur nicht feststellen. Besonders klar geht dies aus dem Versuche 16 B (Pepsinwirkung bei 40°, dann bei 65°) hervor. Der von uns gefundene Wert in 16 E von 7,6 % Trichloressigsäure fällbarer Substanz entspricht den von *Wasteneys* und *Borsook* bei 40° und derselben N-Konzentration angegebenen Zahl: 7,4 %.

Faßt man die bisherigen experimentellen Befunde zusammen, so müssen Bedenken dagegen erhoben werden, daß das von *Wasteney*s und *Borsock* beobachtete und von uns in allen einzelnen Teilen bestätigte Phänomen der Gewinnung schwerer löslicher Produkte durch die Pepsineinwirkung auf hochkonzentrierte, wasserlösliche Eiweißabbauprodukte bei p_H 4 bis 5 oder durch die Trypsineinwirkung bei p_H 5,5 tatsächlich eine Synthese ist. Unter den angeführten Bedingungen erscheint die Wirkung des Pepsins in den hochkonzentrierten Eiweißabbauprodukten als eine Desamidierung¹, die des Trypsins als eine einfache Weiterspaltung des Substrats, in beiden Fällen unter Bildung schwer löslicher Produkte.

Diese Annahme ist durch folgende Beobachtungen gestützt. 1. Im Verlauf der Reaktion, deren Ergebnis das Auftreten von trichloressigsäurefällbaren Substanzen ist, wird stets ein Verlust von Aminostickstoff beobachtet. Die Menge der COOH-Gruppen bleibt aber stets gleich. 2. In dem Casein fanden wir einen Vertreter der Gruppe, deren Bausteine nicht imstande sind, eine Resynthese (im Sinne von *Wasteney*s und *Borsock*) zu dem Ausgangsprotein herbeizuführen. (*Wasteney*s und *Borsock* fanden dieses Phänomen bei der Gelatine.) Verfolgt man nun beim Casein die Verhältnisse der NH_2 - und COOH-Gruppen im Verlauf der Reaktion, so findet man, daß hier keine Aminostickstoffabspaltung, wie beim Ovalbumin und Serumalbumin statthat. 3. Die Größe des NH_2 -Schwundes schwankt in den einzelnen Versuchen, doch so, daß bei hoher NH_2 -Abspaltung die Menge der mit Trichloressigsäure fällbaren Substanz ebenfalls hoch ist. (Versuche 2 A, B und D; Versuche 16 B und E.) 4. Kocht man die eingeeengten Substrate vor dem Ansatz mit Pepsin auf, so findet man eine nennenswerte Abspaltung von COOH- und NH_2 -Gruppen durch das Kochen (Tabelle V). Der Widerspruch, der scheinbar darin besteht, daß eine Erhöhung der Zahl der NH_2 -Gruppen nicht anzutreffen ist, beruht darauf, daß die frei gewordenen Aminogruppen abgespalten werden. In Übereinstimmung mit Beobachtungen früherer Forscher müssen wir bei dem Kochprozeß einen tiefen Eingriff in das Molekülgefüge des Substrats annehmen. Trotzdem gelingt es, durch Pepsin unter den bekannten Bedingungen auch an diesem gekochten Substrat eine „Synthese“ hervorzurufen.

Zur weiteren Stütze unserer oben dargelegten Ansicht versuchten wir, den Prozeß der Desaminierung der Substrate auf rein chemischem Wege durchzuführen. Folgende Versuchsanordnung führte zum Ziel.

1,5 ccm der eingedickten Ovalbuminabbauprodukte, die keine Fällung mit Trichloressigsäure gaben, wurden mit 3 ccm Eisessig und 10 ccm einer

¹ Der Nachweis, daß diese desamidierende Wirkung wirklich dem Pepsin zuzuschreiben ist, steht aber noch aus.

30%igen Natriumnitritlösung versetzt. Nach Ablauf der energischen Reaktion zeigt sich, daß die vorher klare Lösung stark getrübt ist und eine klumpige Fällung aufweist. An die jetzt erfolgte Neutralisation mit 30%iger Natronlauge schließt sich ein Zusatz von Trichloressigsäure an. Nach mehrstündigem Stehen wird die entstandene dicke Trübung abfiltriert und mit großen Mengen destilliertem Wasser gewaschen. Auch in verdünnten Ovalbuminlösungen kann man bei dieser Versuchsanordnung einen Niederschlag erzielen. Nicht hingegen bei Caseinabbauprodukten, weder in verdünnter noch in eingedickter Lösung des Substrats. Diese Beobachtungen lassen sich gut im Sinne unserer Ansicht über die Natur der „synthetischen“ Produkte verwerten.

Läßt man auf die Trichloressigsäurefiltrate der durch Pepsin-desaminierten Ansätze salpetrige Säure einwirken, so erfolgt nur eine äußerst geringe Vermehrung der Fällbarkeit mit Trichloressigsäure. Sie steht erheblich zurück hinter der Menge des ausfällbaren Anteils in Ansätzen, die noch nicht der Einwirkung des Pepsins unterworfen waren. Die durch salpetrige Säure dargestellten Produkte waren schwer löslich in Wasser, löslich in Alkali. Beim Ansäuern fällt das Produkt aus der alkalischen Lösung zum Teil wieder aus. Suspensiert man es in einem Milieu von p_H 1,5 und überläßt es der peptischen Verdauung, so wurde es nicht angegriffen. Der Quotient Amino-N : Gesamt-N betrug in zwei Proben des Produkts 8,8 und 8,6.

5. Bei einer Desaminierung muß Ammoniak abgespalten werden. Trotz der technischen Schwierigkeiten, dieses abgespaltene Ammoniak nachzuweisen (bei zu hoher Alkalität des Analysenansatzes spaltet man erhebliche Mengen Ammoniak aus der Muttersubstanz ab, zu vorsichtig durchgeführte Alkalisierung gibt ungenügende Ausbeute an der wirklich vorhandenen NH_2 -Menge), haben wir in dieser Richtung im ganzen befriedigende Resultate erzielt. Unsere Analysenbefunde sind allerdings nur qualitativ auszuwerten und sie müssen durch weitere Versuche ergänzt werden. Sie sind in der Tabelle VII zusammengestellt.

Tabelle VII.

Protokoll-Nr.	Ansatz	Abgespaltenes Amino-N mg.-%	Gefundener NH_3 -N mg.-%	Versuchsanordnung
9	A	—	50,0	Ausgangssubstrat
9	B	180,0	140,0	Aus A + 10% Pepsin 48 Std./40°
9	C	118,0	70,0	Gekocht und sofort analysiert
9	D	182,0	154,0	Gekocht u. 48 St. bei 40° gehalten
11	A	—	70,0	Ausgangssubstrat
11	B	140,0	133,0	Aus A + 10% Pepsin 48 Std./40°
13	A	—	83,0	Ausgangssubstrat
13	B	266,0	221,0	Aus A + 10% Pepsin 48 Std./40°

Anmerkung zu Tabelle VII: Die hierin angeführten Versuche 9, 11 und 13 sind bezüglich ihrer Analysenwerte (Gesamt-N, Rest-N, $COOH$ - und NH_2 -Werte) in Tabelle I wiederzufinden. Dort ist auch das „Ausgangssubstrat“ genau charakterisiert. Es wurde der Effekt der Einwirkung des

Tabelle VIII.

Substrat und Protokoll-Nr.	Datum	Willstätter-Titrat 100 g Substr. verbr. ccm n/5 KOH	van Slyke g-% Amino-N g	Zuwachs in ccm		Bemerkungen
				0/0 n COOH	0/0 n-NH ₂	
6%iges Ovalbumin Kahlbaum A + 2% Pepsin	15. I.	—	—	—	—	Nicht analysiert
	1. II.	361,0	0,06115	—	—	Neu eingestellt $p_H = 1,3$
	14. II.	381,0	0,0937	4,0	2,32	Stark gallertig
	16. II.	383,0	0,09713	4,4	2,57	—
	18. II.	388,0	0,1096	5,4	3,46	+ 2 g Pepsin Stark gallertig
	21. II.	393,0	0,1172	6,42	3,93	+ 1 g Pepsin Stark gallertig
	25. II.	411,0	0,1340	10,0	5,20	+ 2 g Pepsin Helit sich be- trächtlich auf
6%iges Serumalb. C eigene Dar- stellung + 2% Pepsin	31. I.	318,0	0,1563	—	—	$p_H = 1,3$
	1. II.	333,0	0,1708	3,0	1,0	+ 1 g Pepsin
	7. II.	347,0	0,1998	5,8	3,1	—
	11. II.	350,0	0,2022	6,4	3,3	—
	14. II.	353,0	0,2094	7,0	3,8	+ 1 g Pepsin
	18. III.	357,0	0,2140	7,8	4,12	—
	21. III.	358,0	0,2221	8,06	4,7	—
	23. III.	362,0	0,2232	8,92	4,77	—
6%iges Serumalb. Lösung D + 2% Pepsin	9. II.	247,0	0,0850	—	—	$p_H = 1,6$
	11. II.	288,0	0,125	7,84	2,86	—
	18. II.	291,0	0,1516	8,8	4,18	+ 2 g Pepsin
	23. II.	299,0	0,1764	10,4	6,5	—
6%ige Ovalbumin- lös. (Merck) E + 2% Pepsin	10. II.	127,0	0,03486	—	—	$p_H = 1,8$
	12. II.	140,0	0,0729	2,52	2,71	$p_H = 2,5$
	15. II.	227,0	0,0725	—	—	$p_H = 1,4$
	18. II.	240,0	0,0812	2,60	0,62	—
	23. II.	250,0	0,0922	4,62	1,41	—
6%iges Ovalbumin (Merck) Lösung F + 3% Pepsin	22. II.	164,3	0,05142	—	—	$p_H = 1,6$
	23. II.	184,8	0,08545	4,1	2,43	—
	25. II.	195,3	0,0962	6,2	3,2	—
	28. II.	201,7	0,1187	7,48	4,8	—
	2. III.	203,4	0,1274	7,82	5,42	—

Pepsins auf die konzentrierten peptischen Verdauungsgemische von Ovalbumin (Merck) bei einem p_H von 4,23 (Versuch 9), 5,52 (Versuch 11) und 4,1 (Versuch 13) beobachtet. In der Tabelle wird nur der abgespaltene NH_2-N und der gefundene NH_3-N verglichen. In 9 B, 11 B und 13 B hatte, wie aus Tabelle I zu ersehen ist, eine erhebliche „Synthese“ stattgefunden; der Verlust an NH_2-N (van Slyke) war beträchtlich. Die Methode der NH_3 -Bestimmung differierte in den einzelnen Versuchen. Im Versuch 9 wurde folgendermaßen verfahren. 5 ccm der fünffach verdünnten Ansätze wurden mit n NaOH (gegen Phenolphthalein) neutralisiert, dann in ein weites Reagenzglas eingefüllt, mittels einer mit n/20 H_2SO_4 versetzten Vorlage mit der Vakuumpumpe verbunden. Durch einen am Steigrohr

montierten Trichter wurden dann 2 Tropfen gesättigter Natronlauge und 5 Tropfen Oktylalkohols zugefügt, etwa 3 bis 4 Stunden im Wasserbad von 70° ein mittelstarker Luftstrom durch die Apparatur gesaugt. Im Versuch 11 wurde eine gesättigte Lösung von $\text{Ba}(\text{OH})_2$ zum Neutralisieren verwandt, desgleichen tropfenweise von dieser Lösung während der Luftdurchsaugung zugesetzt. Im Versuch 13 wurden 5 ccm des Ansatzes zuerst mit 45 ccm absolutem Alkohol gefällt, das Filtrat des Koagulums wurde von Alkohol befreit und dann wie in Versuch 11 behandelt. Alle A-Ansätze zeigen geringe Mengen NH_3 . Die NH_3 -Mengen in den B-Ansätzen bleiben hinter den nach der NH_2 -Abspaltung zu erwartenden zurück, was möglicherweise auf eine ungenügende NH_3 -Überführung bei dem angewandten Verfahren des NH_3 zurückzuführen ist. Ansatz C und D (s. Tabelle V) sind „gekochte“ Ansätze. Kocht man nämlich die konzentrierten peptischen Verdauungsgemische, so zeigt sich, daß dieser Prozeß einen Verlust an Amino-N (*van Slyke*) zur Folge hat. Auch da ist also eine NH_3 -Vermehrung zu erwarten. In Ansatz D, der nach dem Kochen noch 48 Stunden bei 40° im Thermostaten gestanden hat, ist das deutlich sichtbar.

6. Bei der tryptischen Verdauung handelt es sich bei den betreffenden Versuchen um eine einfache Weiterverdauung der peptischen Verdauungsgemische, mit der Wirkung, daß in dem vorher klaren Ansatz eine starke Fällung auftritt und eine vorher nicht beobachtete Fällbarkeit mit Trichloressigsäure zu konstatieren ist. Das niedriger molekulare Abbauprodukt ist schwerer löslich als die Muttersubstanz und wird durch Trichloressigsäure fällbar.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Das von *Wasteneys* und *Borsook* beschriebene Phänomen des Auftretens schwer löslicher Produkte während der peptischen und tryptischen Verdauung unter entsprechenden Bedingungen konnte bestätigt werden. Doch sprechen die mitgeteilten Versuche nicht in dem Sinne, daß wir es hier mit synthetischen Produkten zu tun haben.

Beitrag zur Frage über das Eingreifen des Thyroxins in den intermediären Zellstoffwechsel.

Von

Alexander Simon (Budapest).

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Charité
zu Berlin.)

(Eingegangen am 15. Juli 1927.)

Aus den Arbeiten von *Adler* und *Lipschitz* (1), *Ahlgreen* und *Wohlgemuth* (2) u. a. kann der Schluß gezogen werden, daß die Hormone in vieler Hinsicht als eine Art von Aktivatoren und Paralysatoren der Zellstoffwechselermente anzusehen sind. Man konnte sogar Anhaltspunkte geben, an welcher Stelle der noch vielfach unübersehbar komplexen Vorgänge des Zellstoffwechsels die Hormone eingreifen. In dieser Hinsicht ist die Feststellung von *Neuberg*, *Gottschalk*, *Strauß* (3) und *Gottschalk* (4) sehr wichtig, daß das Insulin die intermediäre Acetaldehydbildung des überlebenden Leber- und Muskelgewebes mächtig fördert und daß das Adrenalin denselben Prozeß hemmen kann. Aus ihren Befunden haben *Neuberg* und *Gottschalk* den Schluß gezogen, daß der Mechanismus der Insulinwirkung zum Teil mit der Verbrennung der Kohlehydrate im Zusammenhang steht, und daß der eine Faktor der Hyperglykämie verursachenden Wirkung des Adrenalins eben die Hemmung der Verbrennung der Glucose ist.

Mein Ziel war die Untersuchung der Wirkung des Thyroxins auf die *Acetaldehydbildung* in der Leber, in der Hoffnung, daß durch die Ergebnisse der Arbeit Schlüsse auch auf den Mechanismus der Thyroxinwirkung zu ziehen sind.

Das Tyroxin wurde uns von der Firma Schering in der Form eines von ihr hergestellten Präparats zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen. Das Präparat wurde mit einzelnen Änderungen nach den *Harringtonschen* Vorschriften gewonnen.

Die Methodik der Versuche folgte mit einigen kleinen Änderungen den Beschreibungen des Abfangverfahrens von *Neuberg* und seiner Schule (5).

Die Leber von frisch getöteten Kaninchen wurde nach Herausnahme kurz gewaschen, zwischen Filtrierpapier getrocknet und mit der Fleischmaschine zerkleinert. In den ersten Versuchen bedienten wir uns bei der Zerkleinerung auch eines kleinen Latapie-Apparates, was wir aber dann unterließen, da dadurch die Zeit der Verarbeitung sehr verlängert wurde, was auf die Acetaldehydbildung nicht ohne Einfluß ist. Der Leberbrei wurde dann auf der Wage je nach dem Gewicht in zwei oder drei gleiche Teile geteilt; jeder Teil in einem Erlenmeyerkolben mit Hilfe von dreifacher Menge körperwarmer Tyrodephosphatlösung aufgefangen, mit 3 g frisch hergestelltem $\text{CaSO}_3 + 2 \text{H}_2\text{O}$ versetzt, gut durchgeschüttelt und in den Thermostaten von 38 bis 40° Temperatur gestellt. Zu dem einen Ansatz wurde Thyroxin in zwei Teilen, gleich am Anfang des Versuches und später nach 2½ bis 3 Stunden in neutraler Lösung hinzugefügt. Das Kontrollgefäß bzw. die Kontrollgefäße wurden mit der gleichen Menge Flüssigkeit versetzt. Die Lösung des Thyroxins im neutralen Medium geschah folgendermaßen: Zu 2,5 ccm 2%iger Glykokollösung wurde die gewogene Menge von Thyroxin hinzugegeben und so viel n/10 NaOH aus einer Meßpipette zugetropft, bis sich das Thyroxin auflöste. Dann wurde die Flüssigkeit mit genau soviel Mengen n/10 HCl neutralisiert und so eine opaleszente Lösung erhalten. In einigen Fällen, besonders wenn das Thyroxinpräparat schon einige Monate alt war, erfolgte aus dieser opaleszenten Lösung eine allmähliche Flockung, welche nach Aufschüttelung wieder verschwand. Diese Flockung hinderte die Wirksamkeit des Thyroxins nicht. (Diese Flockung kann man schon mit geringer Menge Albuminlösung verhindern, so daß man mit Recht annehmen kann, daß in der Leberbreisuspension diese Flockung nicht zustande kommt.) In den Versuchen 12, 13 gaben wir das Thyroxin ohne Lösungsmittel, nur in einigen Kubikzentimetern destillierten Wassers suspendiert, zum Ansatz. Zur Pufferung der Versuche bedienten wir uns zweier Stammlösungen von p_{H} 6,5 und 7,0.

Die Autolyse im Thermostaten dauerte 6 bis 7¾ Stunden. Zu diesen kurzdauernden Autolyseansätzen wurde, ebenso wie bei *Neuberg*, kein Desinfiziens gegeben. Im Falle von Versuch 11 wurde als Desinfiziens 1 ccm Toluol benutzt. Nach Beendigung der Autolyse wurden die Ansätze meistens über Nacht im Eisschranke aufbewahrt [wie bei den *Wohlgemuths*chen Versuchen (6)] und morgens aufgearbeitet; die Titration wurde aber statt der vorgeschriebenen n/10 Lauge mit n/20 Lauge ausgeführt.

Das Ergebnis der Versuche gibt die folgende Tabelle.

Nr.	Leber g	Thyroxin- menge mg	pH	Dauer der Autolyse	Acetaldehyd unter Thyroxin- wirkung mg	Acetaldehyd im Kontrollversuch mg	Änderung der Acetaldehyd- bildung %
1	25	0,95	6,5	7h45'	3,52	1,23	+ 186
2	20,5	0,80	6,5	7 00	1,32	2,04	— 35
3	35	1,01	6,5	7 30	4,25	3,13	+ 35
4	35	1,5	6,5	7 45	4,60	3,50	+ 31
5	36	1,2	6,5	7 00	3,16	1,276	+ 147
6	42	1,4	6,5	7 00	1,60	2,20	— 27
7	26	0,95	6,5	7 00	1,76	0,88	+ 100
8	26	1,2	6,5	6 00	0,726	0,85	+ 106
9	27	1,2	6,5	7 00	4,268	3,828	+ 11
10	33	1,3	7,0	7 15	2,134	1,540	+ 38
11	40	1,35	7,0	24 00	1,298	0,374	+ 247
12	33	1,5	7,0	7 00	2,860	2,228	+ 28
13	37	1,2	7,0	6 00	5,434	3,080	+ 76
14	27	1,2	7,0	6 00	1,046	1,584	— 34

+ bedeutet die prozentische Vermehrung der Acetaldehydmenge, bezogen auf den Versuch ohne Thyroxin.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, beeinflusst das Thyroxin die intermediäre Acetaldehydbildung in bedeutender Weise. Unter den untersuchten 14 Kaninchenlebern bekamen wir 11mal Steigerung der Acetaldehydbildung von 11 bis 247%; in drei Fällen stellte sich aber unter denselben Versuchsbedingungen Acetaldehydbildungshemmung heraus, was nicht auf Versuchsfehler zurückzuführen war. Die Menge des Thyroxinpräparates, von welcher man eine Wirkung erhielt, war von derselben Größenordnung wie die Adrenalinmengen, welche nach dem *Gottschalk*schen Versuche wirksam waren. *Neuberg* und *Gottschalk* konnten bei ihren Untersuchungen nur eine Wirkung nach einer Richtung beobachten, und zwar Vermehrung bei Insulin oder Verminderung bei Adrenalin. Immerhin ist die Feststellung von *Wohlgemuth* interessant, nach welcher unter Insulinwirkung im Gehirn Acetaldehydbildungshemmung zustande kommt (6).

In der Annahme, daß die Ursache des Befundes, daß in den Versuchen 2, 6, 14 Zufügung von Thyroxin nicht zu einer Vermehrung, sondern zur Verminderung der Aldehydmenge (im Vergleich zur Kontrolle) geführt hat (was wir auf eine Beeinflussung der Bildung des Acetaldehyds zurückführen), darin lag, daß das Thyroxin je nach der Konzentration die Acetaldehydbildung verschieden beeinflusst, haben wir zwei Kaninchenversuche unter Anwendung verschiedener Thyroxinmengen ausgeführt.

3. Juni. Erster Ansatz: 25 g Leberbrei, 75 ccm Thyrodephosphatlösung, 1,2 mg Thyroxin, 3 g CaSO₃, 6½ Stunden lang im Thermostaten von 40° Temperatur. Acetaldehyd = 2,974 mg.

Zweiter Ansatz: Wie erster Ansatz, aber nur 0,54 mg Thyroxin. Acetaldehyd = 3,344 mg.

Dritter Ansatz: Kontrolle wie erster Ansatz, nur ohne Thyroxin. Acetaldehyd = 1,254 mg.

10. Juni. Erster Ansatz: 24 g Leber, 75 ccm Tyrodephosphatlösung, 2,58 mg Thyroxin (in Suspension), 3 g CaSO_4 , 6½ Stunden lang im Thermostaten von 40°. Acetaldehyd = 1,606 mg.

Zweiter Ansatz: Wie erster Ansatz, nur 0,8 mg Thyroxin (in Suspension). Acetaldehyd = 1,562 mg.

Dritter Ansatz: Kontrolle ohne Thyroxin. Acetaldehyd = 2,068.

Im ersten Versuch wurde also trotz der verschiedenen Thyroxinmengen nur *Steigerung*, im zweiten nur *Hemmung* erhalten. Diese zwei Versuche erwiesen sich als nicht genügend zur Feststellung der eventuellen entgegengesetzten, von der Konzentration abhängenden Wirkung des Thyroxins. Die Untersuchungen in dieser Richtung wurden aber trotzdem eingestellt, da auch andere Erklärungen möglich sind, so daß wir uns vorläufig mit der Tatsache begnügen müssen, daß auch hemmende Wirkungen zutage treten.

Des weiteren sollte ein orientierender Anhaltspunkt dafür gewonnen werden, ob diese Beeinflussung der Acetaldehydbildung auf den Abbau der Kohlehydrate oder der Aminosäure zu beziehen ist. Es war schon von vornherein die Möglichkeit des ersten Falles sehr wahrscheinlich, da nach den Untersuchungen von Romeis (7) Thyroxin, ebenso wie frische oder getrocknete Schilddrüse, imstande ist, bei Mäusen nach Injektionen den Glykogengehalt der Leber sehr stark herabzudrücken. Bodansky und Löhr (8) haben nach Thyroxininjektionen nur leichte Glykämie beobachtet, wodurch das Verschwinden des Glykogens nicht genügend erklärt ist.

Zur Prüfung dieser Frage wurde verglichen die Acetaldehydbildung im Leberbrei desselben Kaninchens unter der Wirkung einer bestimmten Menge von Thyroxin, dann unter derselben Menge Thyroxin, wenn der Ansatz auch mit 1,0 g Glykogen versetzt wurde; es wurde auch ein dritter Ansatz bereitet, worin zum Leberbrei nur 1,0 g Glykogen kam, und in einem zweiten Versuch wurde die Acetaldehydbildung neben den vorher beschriebenen Ansätzen auch in einem vierten Ansatz beobachtet, wo der Leberbrei ohne Thyroxin und ohne Glykogen sich befand.

Der Gedanke dieser Versuchsanordnung war, daß, wenn die Änderung der Acetaldehydbildung in der Leber unter Thyroxinwirkung auf den Abbau der Kohlehydrate zu beziehen ist, bei Zusatz des Glykogens die Größe der Änderungen unter Thyroxinzusatz stärker hervortreten muß als bei einer geringeren Glykogenmenge der Leber.

Die Versuche wurden wie folgt ausgeführt:

4. Juni. Erster Ansatz: 25 g Leber, 75 ccm Tyrodephosphatlösung, 1,0 mg Thyroxin, 3,0 g CaSO_3 , $6\frac{1}{2}$ Stunden lang im Thermostaten von 40° . Acetaldehyd = 3,718 mg.

Zweiter Ansatz: Wie erster Ansatz, 1,02 mg Thyroxin, 1,0 g Glykogen. Acetaldehyd = 4,158 mg.

Dritter Ansatz: Wie erster Ansatz, ohne Thyroxin, nur 1,0 g Glykogen. Acetaldehyd = 3,058 mg.

9. Juni. Erster Ansatz: 25 g Leber, 75 ccm Tyrodephosphatlösung, 0,8 mg Thyroxin, 3 g CaSO_3 , $6\frac{1}{2}$ Stunden lang im Thermostaten von 40° . Acetaldehyd = 1,93 mg.

Zweiter Ansatz: Wie erster Ansatz, 0,8 mg Thyroxin, 1,0 g Glykogen. Acetaldehyd = 1,056 mg.

Dritter Ansatz: Wie erster Ansatz, ohne Thyroxin, 1,0 g Glykogen. Acetaldehyd = 3,498 mg.

Vierter Ansatz: Wie erster Ansatz, ohne Thyroxin und ohne Glykogen. Acetaldehyd = 2,816 mg.

Diese Versuche scheinen dafür zu sprechen, daß die veränderte Acetaldehydbildung unter Thyroxinwirkung auf den Abbau der Kohlehydrate zu beziehen ist, doch sind die Versuchsergebnisse nicht eindeutig genug, um aus ihnen sichere Schlüsse zu ziehen.

Zusammenfassend kann also behauptet werden, daß neben Insulin und Adrenalin auch das Thyroxin imstande ist, die Bildung des wichtigen intermediären Stoffwechselprodukts, des Acetaldehyds, zu beeinflussen. In der Mehrzahl der Fälle kommt eine beträchtliche Vermehrung der Acetaldehydmenge zustande, man findet aber auch Verminderungen, deren Ursache bisher unklar ist. Die Änderung der Acetaldehydbildung unter Thyroxinwirkung scheint auf Beeinflussung des Kohlehydratstoffwechsels zu beruhen. Die Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen und werden fortgesetzt.

Ich möchte auch an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank dem Herrn Prof. P. Rona aussprechen, der mir die Ausführung dieser Arbeit in seinem Institut erlaubt hat, und der mich während der Arbeit mit Ratschlägen in der lebenswürdigsten Weise ständig unterstützt hat.

Literatur.

1) Adler und Lipschitz, Arch. f. exper. Path., Jahrg. 1922. — 2) Ahlgreen, Klin. Wochenschr., Jahrg. 3, 1923; Wohlgemuth und E. Klopstock, diese Zeitschr. 175, 202, 1926. — 3) Neuberg, Gottschalk und Strauss, Deutsche med. Wochenschr. 1923, Nr. 45. — 4) Gottschalk, diese Zeitschr. 155, 348, 1925. — 5) Neuberg und Reinfurth, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 52, 1690, 1919; Neuberg und Gottschalk, diese Zeitschr. 146, 164, 1924. — 6) Wohlgemuth, diese Zeitschr. 175, 232, 1926. — 7) Romeis, ebendasselbst 135, 85, 1923. — 8) Löhr, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 53, 618.

Eine quantitative Mikromethode zur Fraktionierung der Serumweißkörper durch Elektrodialyse.

Von

A. Tóth (Pécs, Ungarn).

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts
der Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 15. Juli 1927.)

Mit 12 Abbildungen im Text.

Dem Verhalten der einzelnen Serumweißkörper wird sowohl von biologischer als von klinischer Seite immer mehr und mehr Interesse entgegengebracht. Die zur Bestimmung der einzelnen Fraktionen dienenden Methoden sind aber meistens mit gewissen Schwierigkeiten verbunden. Es reicht entweder die Genauigkeit der Methode nicht aus oder aber sind zur Bestimmung teure und nicht überall zugängliche Apparate erforderlich, andererseits sind die meisten Methoden nicht geeignet, mit ihnen besonders in der Klinik in Betracht kommende Serienuntersuchungen anstellen zu können.

Ich habe selber verschiedene Methoden zur Darstellung des Globulins erprobt. Ich habe ins verdünnte Serum CO_2 eingeleitet. Es stellte sich heraus, daß selbst nach über 1 Stunde dauerndem Einleiten und 24 Stunden Stehenlassen nur ungefähr 5% des Gesamteiweißes, also etwa $\frac{1}{20}$ Teil des erwarteten Niederschlags, ausgeschieden war. Des weiteren habe ich die Aussalzung angewendet. Will man aber die einzelnen Fraktionen getrennt bekommen, und erwartet man von der Methode, daß man durch Addition der Fraktionen das Gesamteiweiß zurückbekommt, so dauert die Trennung tagelang, und bei dieser langen Dauer sind größere Eiweißverluste kaum zu vermeiden, so daß in meinen mit großer Sorgfalt ausgeführten Versuchen bei den besten Resultaten der Fehler immer noch 3 bis 4% betrug.

Es ist eine nephelometrische Mikromethode durch *Rusznayák* (1) angegeben worden, die für klinische Zwecke geeignet ist, es ist aber ein teureres Instrument zur Methode nötig, das nicht überall zur Verfügung steht.

Mit der durch *Robertson*¹ angegebenen refraktometrischen Methode zur Bestimmung der Serumweißfraktionen habe ich keine eigene Erfahrung.

In der letzten Zeit ist zur Fraktionierung der Serumweißkörper die Elektrodialyse mehrfach angewendet worden, was desto angesehener erscheint, als die Auffassung immer mehr und mehr Platz greift, daß man unter Globulinen diejenigen Eiweißkörper des Serums verstehen soll, die nur bei Anwesenheit von Elektrolyten löslich sind, bei Mangel solcher aber ausfallen. Es sind sowohl zur industriellen Ausnutzung dieses Umstandes als zu Untersuchungszwecken verschiedene Apparate angegeben worden, die aber meist mit größeren Flüssigkeitsmengen arbeiten und schon deswegen die Ansprüche des Klinikers nicht befriedigen können. Andererseits ist die Handhabung der Apparate zu umständlich, die Dauer der Dialyse zu lang, und dann vor allem die quantitative Gewinnung der einzelnen Fraktionen zu schwierig, als daß diese Methode im klinischen Untersuchungsgebiet und überall dort, wo es auf schnelle Untersuchung kleiner Serummengen ankommt, eine größere Verbreitung gefunden haben könnte.

Es schien mir daher angebracht, auf Anregung des Herrn Prof. *Rona* zu versuchen, die Elektrodialyse (E. D.) in einer Form auszugestalten, in der die erwähnten Schwierigkeiten womöglich behoben sind und vor allem der Anwendbarkeit von kleinen Serummengen und einer quantitativen Trennung der Eiweißfraktionen in denselben Sorge getragen wird.

Es ergaben sich also zunächst folgende Aufgaben:

1. Es sollte eine geeignete Apparatur zusammengestellt und deren Material so gewählt werden, daß höchstens 1 ccm Serum zur Untersuchung nötig sei.
2. Es sollte die quantitative Zurückgewinnung der einzelnen Fraktionen bewerkstelligt werden.
3. Die in Frage kommenden Membrankombinationen sollten ausprobiert werden.
4. Der Vorgang der E. D. betreffs Reaktions- und Leitfähigkeitsänderung, sowie Niederschlagsbildung sollte bei der gegebenen Anordnung untersucht werden.

Beschreibung des Apparates.

Von den verschiedenen zur E. D. angegebenen Apparaten schien mir die von *Reiner* (2) vorgeschlagene Anordnung am meisten zum weiteren Ausbau geeignet. Deswegen habe ich, die Vorteile dieser

¹ *Robertson*, Journ. of biol. chem. 22, 233, 1915.

Anordnung mir vor Augen haltend, meine Apparatur folgendermaßen zusammengestellt (s. Abb. 1)¹.

Die wesentlichsten Teile des Apparates sind zwei ineinander zu steckende halbdurchlässige Membranen (*A* Anodenmembran und *K* Kathodenmembran). Ich habe mir als Kathodenmembran eine Kollodiumhülse hergestellt von der Form und Größe eines Zentrifugenglases (88 mm lang

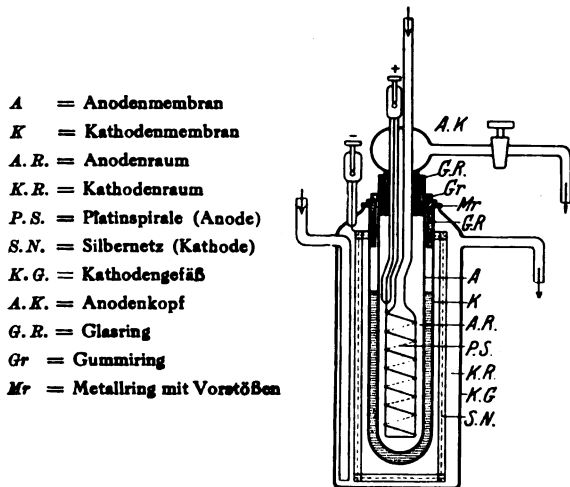


Abb. 1.

und von 21 mm innerem Durchmesser), der aber, da Kollodium bei der kleinsten Austrocknung stark schrumpft und sich verunstaltet, eingewisser Halt gegeben werden sollte, besonders deswegen, weil ich zur Trennung des Niederschlags von dem in Lösung bleibenden Anteil nach der Dialyse die Zentrifuge benutzen wollte. Dies wurde dadurch erreicht, daß ich die eigentliche Kollodiumhülse mit einem Seidensäckchen gefüttert habe, so daß Stückchen von der Rohseide von der entsprechenden Größe und von der Form, wie Abb. 2 zeigt, ausgeschnitten worden sind, und damit habe ich das zur Herstellung der Kollodiummembran dienende und mit Gelatine überzogene Glasrohr von außen bekleidet. Dabei kamen die beiden Längsränder der Seide genau aufeinander zu liegen, die Spitzen aber gaben, am Boden des Glases zusammengelegt, den Boden des Seidensäckchens ab. In diesem Zustande sind sowohl die Längsränder als die Spitzenränder mit Zaponlack (Kollodium in Amylacetat) zusammengeklebt worden und nun das so

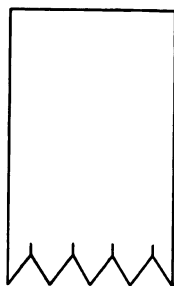


Abb. 2.

armierte Rohr in 6%ige Kollodiumlösung getaucht, in horizontaler Lage so lange gedreht, bis die Kollodiumschicht fest, aber noch etwas

¹ Der Apparat wird in der hier beschriebenen Ausführung durch die Firma Fritz Fischer & Röwer, Stützerbach i. Thür., hergestellt. Dortselbst sind auch gebrauchsfertige Kollodiummembranen zu erhalten. D. R.-P. a.

feucht-klebrig war, dann ist das Rohr ein zweites Mal mit Kollodium überzogen, wieder in horizontaler Lage gedreht und etwa 5 Minuten lang getrocknet (so lange, bis das Kollodium beim Anrühren die Haut nicht mehr benetzt), dann ist die Membran in kaltes Wasser getaucht worden, um die Kollodiumschicht zu härten. Nach etwa 10 Minuten Verweilen im Wasser, kann die Membran, die fest an die Seide anklebt, vom Glasrohr abgezogen werden, indem man das Rohr in warmes Wasser taucht und die Gelatineschicht zum Auflösen bringt. Diese Membranen waren in der später zu beschreibenden Weise ganz gut zentrifugierbar, zeigten aber beim Gebrauch den Nachteil, daß beim Zentrifugieren der Niederschlag so fest in die Maschen der Seide hineingepreßt wurde, daß er nur schwer von dort auszulösen war, was immer einen Eiweißverlust verursacht hat. Deswegen war mein Bestreben, die Maschen der Seide irgendwie zu verstopfen, und dies gelang mir dadurch, daß ich die Seide selbst, um die einheitliche Natur der Membran zu bewahren, mit Kollodium imprägnierte. Zu diesem Zwecke ist ebenfalls eine Kollodiumlösung in Amylacetat verwendet worden, womit die Seide vor dem Anlegen an das Glasrohr mehrmals getränkt wurde. Dieses Verfahren hat sich sehr gut bewährt, dadurch war nämlich der Eiweißverlust zu vermeiden, andererseits sind die Membranen selbst resistenter geworden und die Seide bleibt, mit Wasser angefeuchtet, auch nach dem Imprägnieren ganz gut formierbar, besonders wenn man die zu formierenden Teile, wie z. B. die Spitzen, vor dem Anlegen an das Glasrohr nochmals mit Zaponlack anfeuchtet. Diese Seidesäckchen sind dann ebenso wie oben beschrieben mit Kollodium überzogen worden. In sämtlichen in dieser Arbeit angeführten Versuchen mit Kollodiummembranen sind ähnlich hergestellte Hülsen verwendet worden, sowohl als Anoden- als auch Kathodenmembranen. Bei den Anodenmembranen war nur der Maßstab so gewählt (92 mm Länge, 15 mm innerer Durchmesser), daß bei deren Einlegen in die Kathodenmembran zwischen den beiden ein etwa 10 ccm fassender Raum zur Aufnahme der zu dialysierenden Flüssigkeit übrigblieb.

In einem Teile der Versuche sind anstatt der Kollodium- als Anodenmembran Chromgelatinemembranen angewendet worden. Bei der Herstellung derselben muß zunächst folgendes beachtet werden: Das zur Formierung der Hülsen dienende Glasrohr darf nicht mit Gelatine überzogen werden, da diese Gelatineschicht durch das Ammoniumbichromat, womit man die zum Bestreichen der Membran benutzte Masse herstellt, mitgegerbt und unlöslich gemacht wird, so daß man die Hülsen vom Glasrohr durch Eintauchen in warmes Wasser nicht herunterziehen kann. Darum muß das Rohr mit einer dünnen Schicht von Paraffin überzogen werden. Des weiteren müssen die Längsseiten der Seide mit einer fortlaufenden Naht zusammengehalten werden, wobei der Boden ebenso geformt wird, wie bei der Kollodiummembran.

Zum Bestreichen der Seide wurde eine Masse verwendet, die nach *Ruppel* aus 10 g Gelatine, 3 g Ammoniumbichromat, 5 g Glycerin in 100 ccm Wasser bestand. Mit dieser Mischung wurde die Seide dreimal bestrichen und 2 Wochen lang belichtet, während der Zeit die Membran am Formierungsglas belassen worden ist. Nachdem die Membran ganz grün geworden ist, ist sie durch Eintauchen in warmes Wasser heruntergezogen, in täglich mehrmals gewechseltem destilliertem Wasser mehrere Tage gewässert und vor dem Gebrauch so lange ein elektrischer Strom durch die Membran hindurchgeschickt worden, bis die anfangs hohe Leitfähigkeit allmählich abnahm und sich über 1 Stunde nicht mehr geändert hat.

Sowohl die Kathoden- als die Anodenmembranen sind, nachdem sie auf die gewünschte Länge geschnitten worden sind, an ihrer Öffnung mit einem Glasring versehen worden (Abb. 1, *GR*), der einerseits eine Schrumpfung des oberen Teiles verhindert, andererseits der Kathodenmembran beim Zentrifugieren den nötigen Halt gab.

Die Membranen sind außer Gebrauch dauernd unter toluolisiertem Wasser zu halten und auch während des Gebrauchs vor jedem längeren Austrocknen zu bewahren. (Einige Minuten Stehen an der Luft beeinträchtigt die Brauchbarkeit der Membranen nicht.)

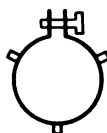


Abb. 3.

Zum Gebrauch wird die Anodenmembran mit einem Gummiring (Abb. 1, *Gr*), die Kathodenmembran aber mit einem Metallring (*MR* in Abb. 3), der drei Vorstöße hat, versehen. Durch den ersten wird die Anodenmembran in der Kathodenmembran, durch den zweiten diese letztere in dem Kathodengefäß in der gewünschten Lage gehalten. Der Metallring wird außerdem auch beim Zentrifugieren gebraucht.

In die Öffnung der Anodenmembran wird der Anodenkopf eingesetzt. Dieser besteht aus einem in den Glasring der Anodenmembran eingeschlifften Glasstopfen, der innen hohl ist und durch den zwei Glasröhren hindurchgehen. In das eine Rohr ist der Zuleitungsdraht zur Anode eingeschmolzen, das andere aber, das fast zum Boden der Anodenmembran herunterreicht, ist das Wasserzuleitungsrohr. Dieses letztere ist am unteren Ende zu einer Glockenform erweitert und dient auch dazu, um die aus einer Platinspirale (*PS*) bestehende Anode darauf zu wickeln. Am oberen Teile ist diese Glocke mit einem kleinen Höcker versehen, unter welchem der Platindraht beim Aufwickeln hinweggeführt wird, um ein Aufrutschen der Spirale zu verhindern; unten ist der Draht an das Glas angeschmolzen. Der Anodenkopf trägt zum Ableiten des Wassers noch ein drittes, in den oberen hohlen Teil mündendes, mit einem Hahn versehenes Rohr.

Der Kathodenraum (*KR*) wird durch ein etwa 200 ccm fassendes Glasgefäß dargestellt (Abb. 1, *KG*), in das auch ein Wasserzuleitungsrohr führt und am oberen Teile ein Ableitungsrohr angeschmolzen ist. Im Kathodenraum befindet sich die aus einem Silbernetz (*SN*) bestehende Kathode. Diese ist ein nach oben geöffneter Netzzylinder, zu dem der Strom durch einen in das Glas eingeschmolzenen Draht zugeleitet wird.

Der durch Ineinanderstecken der beiden Membrane und Ansetzen des Anodenkopfes zusammengestellte Teil des Apparats wird im Kathodenraum so untergebracht, daß die Kathodenmembran das Silbernetz nirgends berührt, sondern im Kathodenraum frei schwebt.

Die ganze Apparatur steht über einer Glaswanne, wohin das Spülwasser sowohl vom Anoden- als vom Kathodenraum heruntertropft, das jedoch auch getrennt aufgefangen werden kann.

Als Spülwasserbehälter dient eine etwa 20 ccm oberhalb des Apparats aufgestellte Devilleflasche, in deren unterer Öffnung ein T-Rohr angebracht ist, von dem die Zuleitung zum Anoden- bzw. zum Kathodenraum durch dünne Gummischläuche geschieht.

Als Stromquelle diente der Stadtstrom von 220 Volt Spannung und in den Stromkreis war ein Vorschaltwiderstand von 3000 Ohm, eine Kohlenfadenlampe und ein genaues Meßinstrument vor dem Apparat eingeschaltet. Der Apparat kann durch einen Steckkontakt an die Stadtleitung angeschlossen werden, man muß nur die Polbezeichnung genau beachten. Das Meßinstrument ist zur Regulierung des Stromes nicht unbedingt

nötig, sondern man kann den Strom durch den Vorschaltwiderstand mit Hilfe der Lampe in der weiter unten zu beschreibenden Weise mit genügender Genauigkeit regulieren.

Beschreibung der Methode.

Mit dem beschriebenen Apparat geschieht nun die E. D. folgendermaßen:

1 ccm Serum wird mit einer 1-ccm-Pipette (zum Ausblasen!) in die Kathodenmembran eingemessen, die Pipette mit destilliertem Wasser dreimal nachgewaschen und dann noch 4 ccm destilliertes Wasser dem Serum zugefügt, so daß dadurch das Volumen der Mittelflüssigkeit 8 ccm und das Serum somit 1 : 8 verdünnt wird. Das Serum wird mit dem Verdünnungswasser durch Umschwenken gründlich vermischt und die mit dem Anodenkopf versehene Anodenmembran in die Kathodenmembran eingesetzt und die letztere wieder im Kathodenraum in der oben beschriebenen frei schwebenden Lage untergebracht. Dabei stemmen sich die Vorstöße des Metallringes der Kathodenmembran an den oberen Rand des Kathodengefäßes an. Jetzt wird die Spülung angelassen, wobei gar nicht einerlei ist, wie man die Spülgeschwindigkeit wählt. Vor allem ist eine allzu kräftige Spülung besonders anfangs zu vermeiden, weil dadurch der Widerstand der Zelle sehr erhöht, die Stromstärke sehr herabgesetzt und dadurch die Dauer der Dialyse eher verlängert als verkürzt wird. Andererseits beansprucht die Chromgelatine-Kollodium-Kombination eine andere Spülgeschwindigkeit, als wenn zwei Kollodiummembranen angewendet werden. Meiner Erfahrung nach spült man im ersteren Falle am besten mit 50 bis 60 Tropfen in der Minute, so daß für eine Dauer von einer Stunde etwa 160 bis 170 ccm Wasser nötig sind, sowohl für den Anoden-, als für den Kathodenraum. Bei Anwendung von zwei Kollodiummembranen hingegen soll die Menge des Spülwassers ungefähr das Doppelte betragen. Über diese Spülgeschwindigkeiten hinauszugehen, ist weder nötig, noch vorteilhaft.

Beim Einschalten des Stromes glüht zunächst die Lampe stark und ist eine starke Gasentwicklung an den Elektroden zu beobachten. Durch die Zelle geht ein Strom von etwa 500 mA Stärke. Durch den Vorschaltwiderstand wird die Stromstärke so reguliert, daß die Lampe eben nicht mehr glüht und an den Elektroden nur eine sehr mäßige Gasentwicklung zu sehen ist. Dann geht durch die Zelle ein Strom von etwa 60 bis 70 mA Stärke und 40 bis 50 Volt Spannung. Mit dieser Stromstärke und Spannung wird die Dialyse begonnen. Bei fortschreitender Entmineralisierung der Mittelflüssigkeit sinkt die Stromstärke ab und nimmt die Spannung dauernd zu, und zwar bei Chromgelatine-Kollodium-Kombination rascher, bei zwei Kollodium-

membranen langsamer, so daß im ersten Falle nach 5 Minuten, im zweiten nach etwa 10 Minuten der Vorschaltwiderstand vollkommen ausgeschaltet werden kann. Bei Handhabung des Vorschaltwiderstandes ist immer die Lampe der Indikator, sie darf während der E. D. niemals glühen; mit deren Hilfe kann man bei einiger Übung die Stromstärke zu Beginn der E. D. so einstellen, daß sie nicht über 60 bis 70 mA beträgt — sonst bilden sich an der Wand der Kathodenmembran braune, unlösliche Eiweißklumpen —, und nach den ersten 5 bzw. 10 Minuten kann der Widerstand vollkommen ausgeschaltet und des weiteren braucht der Strom gar nicht reguliert zu werden.

Die E. D. wird eine Stunde lang fortgesetzt. Diese Zeit genügt, wie aus vergleichenden Untersuchungen sich ergab, vollkommen für beide Membrankombinationen. Der Apparat beansprucht nur etwa in der ersten Viertelstunde eine besondere Aufsicht, wo die Gasentwicklung noch intensiver ist und die gebildeten Gasbläschen besonders das enge Ableitungsrohr des Anodenraumes verstopfen können, wodurch eine Stockung in der Spülung eintreten kann.

Nach beendeter Dialyse wird der Strom ausgeschaltet, die Spülung eingestellt und die Membranteile des Apparates aus dem Kathodenraum herausgenommen. Die Anodenmembran wird sorgfältig mit so viel destilliertem Wasser in die Kathodenmembran abgespült, daß die Mittelflüssigkeit und Spülwasser diese bis zum unteren Rande des Glasringes anfüllt.

Zur Trennung des Niederschlages vom gelöst gebliebenen Teile wird die Mittelflüssigkeit in der Kathodenmembran zentrifugiert. Zum Zentrifugieren dient ein Zentrifugenglas von der üblichen Form mit rundem Boden, worin die Kathodenmembran so hineinpaßt, daß zwischen dieser und dem Glase nur ein Kapillarraum übrigbleibt. Das Zentrifugieren der Kathodenmembran wird durch den am Halse derselben angebrachten Metallring ermöglicht, der durch eine kleine Schraube festgeschraubt und auch auf die Dauer an der Kathodenmembran belassen werden kann. Durch die Vorstöße, die sich an den Rand des Zentrifugenglases anstemmen, wird ein Zusammenknicken der Membran unter der Wirkung der Zentrifugalkraft verhindert. Bevor man die Kathodenmembran in das Zentrifugenglas hineinsetzt, wird dieses letztere durch einige Kubikzentimeter destilliertes Wasser beschickt, so daß beim Einschieben der Membran der Kapillarraum vollständig mit Wasser angefüllt sein soll. Dadurch, daß die Membran sowohl von innen als von außen von Flüssigkeit berührt wird, wird einerseits das Austrocknen, andererseits das Ein- oder Ausstülpfen derselben während des Zentrifugierens verhindert, so daß in diesem Zustande die Membran beliebig lange und mit der größten Tourenzahl zentrifugiert werden kann, ohne dabei verunstaltet oder ausgetrocknet zu werden.

Es wird zunächst 10 Minuten lang bei einer Drehungszahl von 3000 zentrifugiert. Dabei setzt sich der Niederschlag am Boden der Membran als feucht-klebrige Masse nieder und haftet dort so gut, daß die meistens ganz leicht opaleszierende, manchmal ganz klare überstehende Flüssigkeit durch einen kleinen Trichter in einen 50-ccm-Meßkolben so abgegossen werden kann, daß kein Niederschlag mitgerissen wird. Die Membran wird mit destilliertem Wasser bis zum unteren Rande des Glasringes wieder angefüllt, wobei ein Aufschwimmen des Niederschlages womöglich vermieden werden soll, wiederum in das Zentrifugenglas eingesetzt, worin noch das Außenwasser vom vorherigen Zentrifugieren sich befindet, und nochmals 5 Minuten lang zentrifugiert. Das Waschwasser sowie das Außenwasser werden in den Meßkolben gegossen und das Ganze mit destilliertem Wasser auf 50 ccm aufgefüllt (Albumin-Lösung).

Der Niederschlag wird in $n/100$ NaOH gelöst, und zwar zuerst mit 10 ccm der Lauge mittels eines Glasstabes so lange gerührt, bis keinesichtbaren Flocken mehr da sind, dann durch einen kleinen Trichter in einen zweiten 50-ccm-Meßkolben gegossen. Die Membran wird noch 5- bis 6 mal mit je 5 ccm Lauge nachgewaschen und das Volumen der Lösung endlich mit der Lauge auf 50 ccm aufgefüllt (Globulin-Lösung).

Zur Frage des Lösungsmittels soll nur noch kurz bemerkt werden, daß ich dazu verschiedene physiologische Salzlösungen anzuwenden versucht habe. Als beste erwies sich die Tyrode-Lösung, das Lösen dauerte jedoch länger als mit der Lauge und dann war es auch nicht so vollständig, so daß bei Anwendung dieses Lösungsmittels kleine Eiweißverluste nicht zu vermeiden waren. Noch schlimmer waren die Verhältnisse bei Normosal-Lösung, während die 0,9%ige NaCl-Lösung zum quantitativen Lösen des Niederschlages gar nicht zu gebrauchen war. Die Ursache dieser Verschiedenheiten denke ich mit der verschiedenen H^+ -Konzentration dieser Lösungen erklären zu können. Folgende kleine Tabelle zeigt die p_H -Zahlen dieser 3 Salzlösungen:

Tyrode	$p_H = 7,40$
Normosal	$p_H = 6,75$
0,9 % NaCl	$p_H \cong 5,0$

Diese Salzlösungen sind also desto weniger zum Lösen des Globulins brauchbar, je näher ihre p_H -Zahl zum I. P. des Globulins liegt.

Ich habe die Natronlauge als Lösungsmittel beibehalten, weil es bei mir in erster Linie darauf ankam, ein quantitatives Lösen des Niederschlages zu erzielen. In solchen Fällen jedoch, wo es nicht so wichtig ist, den Niederschlag quantitativ zu lösen, sondern vielmehr darauf ankommt, die physiologischen Verhältnisse womöglich beizubehalten, z. B. bei immunologischen Versuchen, würde ich als Lösungs-

mittel die Tyrode-Lösung vorschlagen, niemals aber eine einfache 0,9 %ige Kochsalzlösung.

Die durch die E. D. getrennten Fraktionen können nun beliebig weiterverarbeitet werden. Soll in den beiden Lösungen N-Bestimmung vorgenommen werden, so sind sie vorher zu filtrieren. Es kommt nämlich vor, daß von der Wand der Kathodenmembran sich kleine Kollodiumflierchen lösen, deren N-Gehalt mitbestimmt werden und einen gewissen Fehler verursachen kann.

Versuchsergebnisse.

Des weiteren sollen nun meine bisherigen Versuchsergebnisse angeführt werden, die die Leistungsfähigkeit der Methode beweisen sollen. Es sollte zunächst gezeigt werden, daß aus dem Apparat nach der Dialyse mit der oben geschilderten Methode alles Eiweiß, ohne Verlust, zurückzubekommen ist.

1. Versuche mit Pferdeserum.

Frisches, nicht hämolytisches Pferdeserum wurde toluolisiert und im Eisschrank aufbewahrt. Der N-Gehalt wurde nach *Kjeldahl* bestimmt, daraus der Eiweißgehalt durch Multiplikation mit 6,25 berechnet. Dieser Wert ist in Tabelle I als Gesamteiweiß, bezogen auf 100 ccm Serum, angegeben. Je 1 ccm dieses Serums, auf 8 ccm verdünnt, wurde in der oben angegebenen Weise dialysiert. Nach 10 Minuten wurde die Dialyse abgebrochen, der gebildete Niederschlag durch Zentrifugieren von dem gelöst gebliebenen Teil, wie oben beschrieben, getrennt, in n/100 NaOH gelöst, die Lösungen beider Fraktionen auf 50 ccm aufgefüllt, filtriert und in je 5 ccm der Lösungen nach *Kjeldahl* N-Bestimmungen gemacht, woraus dann der Eiweißgehalt berechnet worden ist. In der Tabelle I sind sowohl die Albumin- und Globulinwerte in Grammen pro 100 ccm Serum, als das Verhältnis der beiden Fraktionen in relativen Prozenten angegeben, wobei das Gesamteiweiß 100 genommen wird. Durch Addition der beiden Fraktionenwerte ist dann der Gesamteiweißwert nach der Dialyse berechnet, die Differenz zwischen den auf zwei Wegen gewonnenen Gesamteiweißwerten gebildet und zuletzt der prozentische Fehler berechnet worden, und zwar immer auf den ohne Dialyse bestimmten Wert bezogen. (In der Tabelle sind die auf die zweite Art berechneten Gesamteiweißwerte nicht, nur die Differenz und die prozentische Abweichung angeführt.)

Nachdem ist die Dialyse wiederholt worden, diesmal aber 20 Minuten lang fortgesetzt und die Mittelflüssigkeit, genau wie oben angegeben, verarbeitet. So sind weitere Dialysen mit einer immer längeren Dauer, bis 2 Stunden, vorgenommen.

Da es sich darum handelte, festzustellen, ob die Membranen Eiweiß durchlassen oder nicht, ist in diesen Versuchen eine Membrankombination angewendet worden, und zwar Chromgelatine als Anoden-, Kollodium als Kathodenmembran.

Tabelle I.
Versuche mit Pferdeserum.

Versuch Nr.	Dauer der Dialyse Min.	Gesamteiweiß	Albumin	Relative %	Globulin	Relative %	Differenz	%
1	10	6,899	5,688	82,6	1,269	18,2	0,058	+ 0,8
2	20	6,899	5,250	76,1	1,794	25,9	0,145	+ 2,0
3	30	6,899	5,469	79,3	1,444	20,9	0,014	+ 0,2
4	40	6,899	4,900	71,0	1,903	27,6	0,096	— 1,4
5	50	6,899	5,206	75,5	1,706	24,7	0,013	+ 0,2
6	60	6,899	5,075	73,5	1,859	26,9	0,035	+ 0,4
7	120	6,899	5,250	76,1	1,706	24,7	0,057	+ 0,8

Aus Tabelle I ist zu ersehen, daß der größte Fehler 2 % beträgt, in den meisten Fällen aber der Fehler 1 % nicht erreicht. Es muß nun bemerkt werden, daß die nach der Dialyse bestimmten Gesamteiweißwerte mit den Fehlern von zwei N-Bestimmungen belastet sind, wobei auch, eine sorgfältige Arbeit vorausgesetzt, mit ungefähr je 1 % Fehler gerechnet werden muß, die, falls gleichgerichtet, selbst einen Fehler von 2 % bei Berechnung des Gesamteiweißwertes ergeben können. Deshalb muß die erreichte Genauigkeit als befriedigend betrachtet werden, und ich glaube, daß, solange zur Eiweißbestimmung die *Kjehldal*-Methode verwendet werden muß, mit diesem hier beobachteten höchsten Fehler gerechnet werden soll.

Was in dieser Tabelle noch beachtenswert ist, ist das prozentische Verhalten des Niederschlages zu dem in Lösung gebliebenen Anteile. Es sind noch größere Schwankungen zwischen den einzelnen Werten, doch ist die Tendenz nicht zu verkennen, daß diese Werte mit fortschreitender Dauer der Dialyse einem Maximalwert zustreben, daß sie diesen Wert endgültig nach den ersten 40 Minuten erreichen und daß dieses Verhältnis dann selbst nach 2 Stunden langer Dauer bestehen bleibt. Es ist allerdings ziemlich schwer, die Versuchsbedingungen bei dieser Arbeitsweise gleichmäßig zu gestalten.

Daß es jedoch bei gleichmäßiger Arbeit nicht unmöglich ist, ein einheitliches Bild über die E. D. mit der beschriebenen Methode zu gewinnen, beweisen die folgenden beiden Parallelversuche, die ich mit Kaninchenserum angestellt habe.

Versuche mit Kaninchenserum.

Das Blut wurde nach der Entnahme 24 Stunden lang im Eisschrank sich überlassen und die Retraktion des Blutgerinnsels ab-

gewartet, dann das klare Serum vom Blutkuchen abgegossen, zentrifugiert und das zentrifugierte Serum, *ohne jeden Zusatz*, dauernd im Eisschrank aufbewahrt. Ich habe das Toluolisieren vermieden, da im Serum unter der Toluolschicht schon nach kurzer Zeit immer eine Eiweißausscheidung stattfindet, die ich vermeiden wollte.

Mit diesem Serum sind ähnlich ausgeführte Versuche angestellt worden, wie oben beim Pferdeserum beschrieben worden sind, nur habe ich immer parallele Dialysen gemacht, und zwar einmal mit Chromgelatine-Kollodiumkombination, das andere Mal mit zwei Kollodiummembranen. (Die hierbei benutzte Chromgelatinemembran war dieselbe, wie in der Versuchsreihe mit Pferdeserum.) Dabei habe ich mir die Aufgabe gestellt, den Vorgang der E. D. in erster Linie vom Gesichtspunkte der Niederschlagbildung, dann aber weiter auch der Reaktionsänderung und Entmineralisierung bei Anwendung der beiden Membrankombinationen vergleichend zu verfolgen.

Die Tabellen IIa und IIb zeigen den Teil der Versuchsergebnisse, die auf die erste Frage, betreffs des Vorganges der Niederschlagbildung, eine Antwort geben.

Tabelle IIa.

Kaninchenserum. Versuche mit Chromgelatine-Kollodiumkombination.

Versuch Nr.	Dauer der Dialyse Min.	Gesamteiweiß	Albumin	Relative %	Globulin	Relative %	Differenz	%
1	10	6,173	5,950	96,5	0,219	3,43	0,004	— 0,07
2	20	6,173	5,031	81,6	1,050	16,9	0,092	— 1,5
3	30	6,173	4,375	71,0	1,750	28,2	0,048	— 0,8
4	40	6,173	4,113	66,6	2,087	33,8	0,027	+ 0,4
5	50	6,173	4,134	67,0	2,034	32,9	0,005	— 0,08
6	60	6,173	4,091	66,4	2,034	32,8	0,048	— 0,8

Tabelle IIb.

Kaninchenserum. Versuche mit zwei Kollodiummembranen.

Versuch Nr.	Dauer der Dialyse Min.	Gesamteiweiß	Albumin	Relative %	Globulin	Relative %	Differenz	%
1	10	6,173	6,038	97,7	0,175	2,9	0,04	+ 0,6
2	20	6,173	5,797	93,8	0,416	6,8	0,04	+ 0,6
3	30	6,173	5,250	85,0	1,021	16,6	0,098	+ 1,6
4	40	6,173	5,119	83,0	1,107	17,8	0,053	+ 0,8
5	50	6,173	4,113	66,6	2,034	33,0	0,026	— 0,4
6	60	6,173	4,134	67,0	2,056	33,3	0,017	+ 0,3

Die einzelnen Spalten der Tabellen sind mit denen der Tabelle I vollkommen analog und ohne weiteres klar. Es zeigt sich zunächst hier auch, daß die Fehlergrenze sich durchweg unter 1 % bewegt, dann weiter, daß die Niederschlagbildung einem Maximalwert zustrebt,

den sie beim Chromgelatine-Kollodiumsystem nach 40 Minuten, bei zwei Kollodiummembranen etwas später, nach 50 Minuten erreicht. Die beiden Grenzwerte sind bei diesem Serum, unabhängig von der angewendeten Membrankombination, gleich, der Gang der Eiweißausscheidung jedoch in den beiden Versuchsreihen etwas verschieden.

Auf die eingehendere Analyse der Niederschlagbildung kommen wir an der Hand der Reaktions- und Leitfähigkeitsänderungen nochmals zurück; hier möchte ich nur noch auf den Umstand hinweisen, daß die Fehler bei Chromgelatine-Kollodiumkombination hier fast durchweg negativ sind, wogegen sie in der Versuchsreihe mit Pferdeserum beinahe alle positiv waren. Mit dieser Beobachtung werden wir uns des weiteren auch noch eingehender beschäftigen müssen.

Um die Reaktionsänderungen in der Mittelflüssigkeit verfolgen zu können, sind mit demselben Serum Versuche angestellt worden, wo ich die H⁺-Konzentration in der Mittelflüssigkeit nach jeden 10 Minuten bestimmt habe. Dazu mußte in jedem Falle die ganze Flüssigkeitsmenge verbraucht werden, so daß zu jeder Messung je eine, immer um 10 Minuten länger dauernde Dialyse gehört. (Um die Leitfähigkeit der dialysierten Flüssigkeit besonders nach längerer Dauer der Dialyse zu erhöhen, und eine genauere Ablesung bei Messung der EMK zu ermöglichen, sind die Flüssigkeiten vor dem Abmessen mit einem Körnchen KCl versetzt worden.)

In derselben Weise sind die Leitfähigkeitsmessungen gemacht worden, wobei zwischen der Dialyse und der Messung nur so viel Zeit verstrichen ist, die dazu nötig war, daß die Flüssigkeit die Temperatur des Wasserbades annehmen konnte. Dieses unverzügliche Messen ist unbedingt notwendig, da sonst, wie darauf *Pauli* (5) hingewiesen hat und ich auch selbst bestätigen kann, die Leitfähigkeit des Dialysats beim Stehen an der Luft stark zunimmt (um etwa das Vierfache in einer Stunde. Siehe Versuch 7 in Tabelle IIIa).

Tabelle IIIa.

Veränderungen der Stromstärke, Reaktion und Leitfähigkeit während der E. D. mit Chromgelatine-Kollodiumkombination.

Versuch Nr.	Dauer der Dialyse Minuten	Stromstärke mA	Reaktion pH	Leitfähigkeit κ
1	1 : 8 verdünntes Serum vor der Dialyse	Anfang mit 60	8,0	$1,67 \cdot 10^{-8}$
2	10	12	6,12	$1,58 \cdot 10^{-4}$
3	20	5,5	5,85	$6,58 \cdot 10^{-5}$
4	30	4	5,48	$1,47 \cdot 10^{-5}$
5	40	3,5	5,42	$1,57 \cdot 10^{-5}$
6	50	2,5	6,47	$2,54 \cdot 10^{-6}$
7	60	2,5	7,32	$9,5 \cdot 10^{-6}$ *

* 1 Stunde vor der Abmessung gestanden.

Tabelle IIIb.

Veränderungen der Stromstärke, Reaktion und Leitfähigkeit während der E. D. mit zwei Kollodiummembranen.

Versuch Nr.	Dauer der Dialyse Minuten	Stromstärke mA	Reaktion p_H	Leitfähigkeit κ
1	1 : 8 verdünntes Serum vor der Dialyse	Anfang mit 60	8,15	$1,67 \cdot 10^{-3}$
2	10	35	3,46	$5,03 \cdot 10^{-4}$
3	20	25	4,30	$1,41 \cdot 10^{-4}$
4	30	20	5,15	$4,65 \cdot 10^{-5}$
5	40	6	5,90	$3,6 \cdot 10^{-5}$
6	50	8,5	6,16	$3,74 \cdot 10^{-5}$
7	60	8,5	6,16	$5,95 \cdot 10^{-5}$

Es ist bei allen diesen Dialysen die Stromstärke anfangs und zum Schluß genau notiert worden und in den Tabellen IIIa und IIIb sind neben den p_H - und Leitfähigkeitswerten auch die Veränderungen der Stromstärke während der E. D. angegeben.

In einer weiteren Versuchsreihe ist dann noch das Volumen der Mittelflüssigkeit nach jeder einzelnen Dialyse abgemessen worden, um

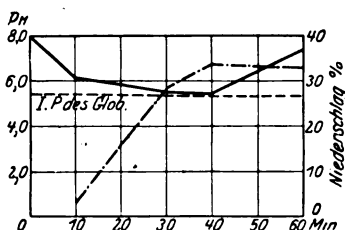


Abb. 4.

Zusammenhang zwischen Reaktionsänderung und Niederschlagsbildung bei Chromgelatine-Kollodiumkombination.

— p_H .
- - - Niederschlag.

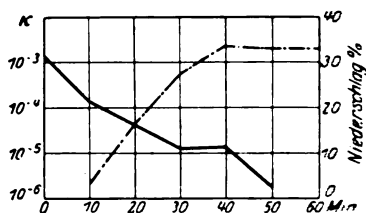


Abb. 5.

Zusammenhang zwischen Leitfähigkeitsänderung und Niederschlagsbildung bei Chromgelatine-Kollodiumkombination.

— Leitfähigkeit.
- - - Niederschlag.

etwaige endosmotische Wasserbewegung während der Dialyse zu verfolgen; es waren aber keine sicher meßbaren Verschiedenheiten zwischen den Volumina nachzuweisen.

Man ersieht aus diesen Tabellen und noch besser, wenn man die Daten derselben kurvenmäßig darstellt (s. Abb. 4 bis 9), daß man bei

Chromgelatine-Kolloidumkombination den Reaktionsgang im allgemeinen dadurch charakterisieren kann, daß er sich zwischen der Anfangsreaktion des Serums und dem I. P. des Globulins bewegt, und ich habe tatsächlich in meinen mehrfach wiederholten Versuchen niemals gesehen, daß die Reaktionsänderungen bei diesem System die genannten beiden Grenzen weder nach oben, noch nach unten überschritten hätten.

Viel größer sind die Reaktionsstörungen bei zwei Kolloidummembranen. Hier stürzt die p_H -Kurve zuerst tief ins saure Gebiet hinunter, und bei wiederholten und mit verschiedenen Kolloidum-

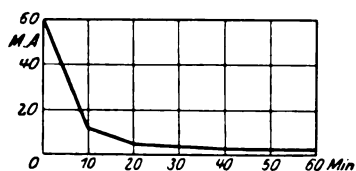


Abb. 6.

Veränderungen der Stromstärke bei Chromgelatine-Kolloidumkombination.

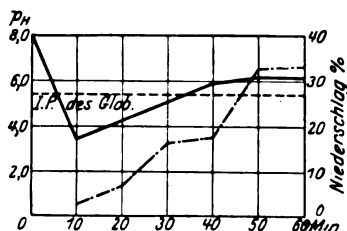


Abb. 7.

Zusammenhang zwischen Reaktionsänderung und Niederschlagsbildung bei zwei Kolloidummembranen.

— p_H .
- - - Niederschlag.

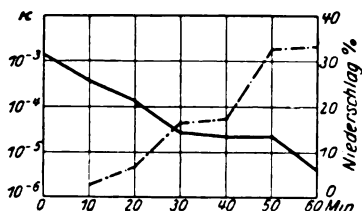


Abb. 8.

Zusammenhang zwischen Leitfähigkeitsänderung und Niederschlagsbildung b. zwei Kolloidummembranen.

— Leitfähigkeit.
- - - Niederschlag.

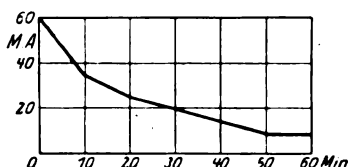


Abb. 9.

Veränderungen der Stromstärke bei zwei Kolloidummembranen.

membranen angestellten Versuchen habe ich immer wieder das gefunden, daß die Reaktion am Anfang der Dialyse immer am sauersten war, dann allmählich näherte sie sich zum I. P. des Globulins, hat ihn sogar in den meisten Fällen etwas überschritten, wie es aus den Daten der Tabelle IV, die die p_H -Werte von zwei weiteren Versuchsreihen enthält, zu ersehen ist:

Tabelle IV.

Reaktionsänderungen während der E. D. bei zwei Kollodiummembranen.

Versuch I		Versuch II	
Dauer der Dialyse	p _H	Dauer der Dialyse	p _H
1 : 4 verd. Serum vor der Dialyse	7,20	1 : 8 verd. Serum vor der Dialyse	7,02
10 Min.	4,10	10 Min.	4,02
20 "	4,88	20 "	4,22
30 "	5,13	30 "	5,18
40 "	5,40	40 "	5,12
50 "	5,50	50 "	5,27
60 "	5,53	60 "	5,27
		120 "	6,27

Aus dieser Gegenüberstellung ergibt sich ein Unterschied, und, wie wir sehen werden, ist das der einzig wesentliche zwischen den Vorgängen bei beiden in meinen Versuchen angewandten Membransystemen. Bei zwei Kollodiummembranen müssen nämlich die Serumeiweißkörper am Anfang der E. D. ihren Ladungssinn verändern, und das geschieht bei Chromgelatine-Kollodiumkombination nicht. Während also bei einem positiv-negativen Membransystem die Globuline aus ihrem natürlichen Ladungszustand, als negative Ionen, entladen werden, müssen sie bei einem negativ-negativen Membransystem zuerst umgeladen und dann erst, als positive Ionen, entladen werden.

Während zwischen beiden untersuchten Systemen hinsichtlich der Reaktionsänderungen diese Verschiedenheiten bestehen, weisen die Kurven der Leitfähigkeitswerte auffallende Ähnlichkeiten bei beiden Kombinationen auf (Abb. 5 und 8).

Am Anfang der E. D. nimmt zunächst die Leitfähigkeit der Mittelflüssigkeit bei beiden Systemen ziemlich gleichmäßig ab. Nach einer Zeit (in beiden Fällen nach 30 Minuten) stellt sich dann ein Stillstand in der Entmineralisierung ein, gekennzeichnet durch das Plateau in dem Kurvengang, wobei die Leitfähigkeitswerte bei beiden Membrankombinationen *von der gleichen Größenanordnung sind*. Dieses Stillstehen dauert bei zwei Kollodiummembranen etwa doppelt so lange, als bei Chromgelatine-Kollodium, und nach dem Plateau kommt dann wieder ein steiler Abfall der Kurve bei beiden Systemen, wobei die Endwerte *wieder von der gleichen Größenordnung sind*, bei zwei Kollodiummembranen jedoch etwas höher liegen als bei Chromgelatine-Kollodium. Der Vorgang der Entmineralisation ist also bei ersterem gegenüber dem letzteren etwas in die Länge gezogen.

Anschließend an die Veränderungen der Leitfähigkeit, möchte ich hier kurz noch meine Beobachtungen bezüglich des Verhaltens der Stromstärke

während der E. D. mit meinem Apparat mitteilen. Ich habe vor dem Einschalten des Stromes den Vorschaltwiderstand erfahrungsgemäß immer so eingestellt, daß beim Einschalten des Stromes die Lampe *nicht* glühte. Dann wurde die Stromstärke genau auf 60 Milliampere einreguliert. (Zur Messung der Intensität ist ein Instrument verwendet worden, das die Ablesung von 0,5 Milliampere gestattet.) Dabei war die Spannung etwa 50 Volt. In den ersten Sekunden kann man eine kleine Zunahme der Stromstärke beobachten, sie macht jedoch nur einige Milliampere aus, so daß die Stromstärke niemals über 70 Milliampere gestiegen ist. (Meine Kohlenfadenlampe hat bei etwa 70 Milliampere angefangen zu glühen.) Beim Chromgelatine-Kollodiumsystem nach 5, bei zwei Kollodiummembranen nach etwa 10 Minuten ist dann der Widerstand vollkommen ausgeschaltet worden, und dann ging die E. D. bei 220 Volt Spannung und abnehmender Intensität weiter, wie Abb. 6 und 9 es zeigen. Vergleicht man diese Kurven mit denen der Leitfähigkeit, so kann man feststellen, daß diese diejenigen Einzelheiten, die die Leitfähigkeitskurven zeigen, nicht bemerken lassen. Es ist deshalb nicht richtig, aus den Veränderungen der Stromstärke irgendwelche Schlüsse auf die Entmineralisation der Mittelflüssigkeit zu ziehen, deren einziger Indikator, auf den man sich verlassen kann, die Leitfähigkeitsmessung ist.

Zeichnet man den Gang der Niederschlagsbildung neben den p_H - und Leitfähigkeitskurven auf, wie es in Abb. 4, 5 und 7, 8 geschehen ist, so sieht man zunächst bei Chromgelatine-Kollodium, daß hier die Niederschlagsbildung eine gleichmäßige ist, die ihren höchsten Wert nach 40 Minuten erreicht. Es sind aber des weiteren noch folgende Einzelheiten hervorzuheben. Beim Vergleich der Niederschlagskurve mit dem p_H sieht man, daß die erstere ihren höchsten Wert dort erreicht, wo die p_H -Kurve den dem I. P. des Globulins entsprechenden Wert annimmt, von da ab bleibt die Menge des Niederschlages konstant. Vergleicht man dieselbe Kurve mit der Leitfähigkeitskurve, so stellt sich heraus, daß, solange die Leitfähigkeit anfangs steil abnimmt, dann eine Weile konstant bleibt, die Menge des Niederschlages immer zunimmt und ihren Höhepunkt im Moment, wo die Leitfähigkeit wieder steil abzufallen beginnt bis zu Werten, die dem Leitfähigkeitswerte des destillierten Wassers entsprechen oder ihm sehr nahe kommen, erreicht.

Bei Anwendung von zwei Kollodiummembranen gestalten sich die Verhältnisse etwas anders. Infolge des starken Reaktionsumschwunges findet in den ersten 20 Minuten nur eine sehr mäßige Eiweißausscheidung statt. Erst nachdem die Reaktion allmählich dem I. P. des Globulins sich nähert, kommt es zu einem stärkeren Eiweißausfall. Es ist aber auffallend, daß eben in der Zeitspanne, wo die p_H -Kurve das isoelektrische Gebiet des Globulins passiert, ein Stillstand in der Niederschlagsbildung zu beobachten ist, nachdem dann wieder ein bedeutender Eiweißausfall stattfindet, wodurch zugleich die Niederschlagsbildung ihren Höhepunkt erreicht.

Untersucht man diesen eigenartigen Verlauf der Niederschlagskurve im Vergleich mit den Leitfähigkeitsänderungen, so stellt sich heraus, daß die Eiweißausfällung dort ihren Stillstand aufweist, wo die Leitfähigkeitskurve in ihr Plateau übergeht, und der Zeitpunkt, wo der Niederschlag seinen maximalen Wert erreicht, die Leitfähigkeit aber wieder steil abzufallen beginnt, hier wie bei dem Chromgelatine-Kollodiumsystem zusammenfallen.

Die Entmineralisierung der Mittelflüssigkeit, gemessen an Leitfähigkeit, läßt also bei beiden Systemen eine ausgesprochene Dreiteilung erkennen. Dazu kommt noch, daß die Niederschlagsbildung bei zwei Kollodiummembranen ebenfalls diese Dreiteilung aufweist.

Ettisch und *Beck* (6) beschreiben die E. D. als einen dreiphasischen Vorgang und unterscheiden eine anfängliche Phase, in der nur eine allmählich sich vermehrende Eiweißausscheidung stattfindet, dann eine zweite, die durch plötzlichen großen Eiweißausfall charakterisiert ist und welche dann in die dritte Phase übergeht, wo die Niederschlagsmenge keine wesentliche Änderung mehr erfährt.

Auf Grund der bisher besprochenen Versuchsergebnisse möchte ich die dreiphasische Einteilung der E. D. auch beibehalten, da es sich aber bei der E. D. in erster Linie um die Entmineralisierung der Mittelflüssigkeit handelt und Reaktionsänderung sowie Niederschlagsbildung nur deren Folgen sind, möchte ich bei dieser Einteilung auf den Gang der Entmineralisation ein besonderes Gewicht legen und als Grund dafür die Leitfähigkeitsänderungen betrachten.

Wenn man sich die besprochenen Veränderungen der Leitfähigkeit vor Augen hält, kann man den Vorgang der E. D. folgendermaßen deuten: Die Kristalloide, die durch die E. D. aus dem Serum entfernt werden, stehen in verschiedenen Beziehungen zu den Kolloiden. Ein Teil derselben ist mit den Kolloiden gar nicht oder nur lose verbunden. Leitet man einen elektrischen Strom durch das Serum, so beteiligen sich in erster Linie diese Kristalloide an dem Stromtransport, und bis sie allmählich entfernt werden, nimmt die Leitfähigkeit ziemlich gleichmäßig ab. Dies wäre die erste Phase der E. D., indem ein Teil der Eiweißkörper zufolge der Milieuveränderung, die eben durch die Störung des Kristalloidbestandes und durch andere Umstände der E. D., wie Membranwirkung usw. hervorgerufen wird, ausfällt.

Ein anderer Teil der Kristalloide ist mit den Kolloiden fester verbunden, so daß es nur durch eine länger andauernde Anwendung von äußeren Kräften möglich ist, sie den Kolloiden zu entziehen. Dieses Zusammenhalten von Kolloiden und Kristalloiden dokumentiert sich dadurch, daß die Abnahme der Leitfähigkeit eine Zeitlang zum Stillstehen kommt, und wie es das Beispiel des zwei Kollodiummembran-

systems zeigt, kommt es eine Weile zu keinem weiteren Eiweißausfall, obgleich das Milieu dazu geeignet wäre, die Reaktion der Mittelflüssigkeit ist doch im Bereiche des I. P. des Globulins. Diese Phase geht dann in die letzte Phase der E. D. über, in der der durch E. D. überhaupt erreichbare Höhepunkt der Niederschlagsbildung erreicht wird, die freigelegten Elektrolyte entfernt werden und dadurch der Endzustand sich einstellt.

Mit den bisher mitgeteilten Versuchen wollte ich entscheiden, ob die E. D. als quantitative Methode zur Fraktionierung der Serumeiweißkörper mit geeigneter Methodik anwendbar ist. Am Beispiel des Kaninchenserums glaube ich bewiesen zu haben, daß beim gleichmäßigen Arbeiten mit der E. D. gleichmäßige Resultate erzielt werden können, und daß es mit den eben zu besprechenden Einschränkungen auch vom Gesichtspunkte der resultierenden Globulinmenge einerlei ist, welche von den beiden untersuchten Membrankombinationen bei der E. D. angewendet wird. Die schon erwähnte Tatsache, daß die Fehler bei der Chromgelatine-Kollodiumkombination bei der zweiten Versuchsreihe, gegenüber der ersten, fast durchweg negativ geworden sind, hat mich aber veranlaßt, weitere Versuche mit anderen Membranen und bei verschiedenen Seren anzustellen.

Versuche mit Menschensera.

Diese Versuche habe ich mit Menschensera angestellt und zur E. D. andere, bisher nicht gebrauchte Membranen angewendet. Die von mir gebrauchte Anodenmembran war jedoch zu gleicher Zeit mit der vorherigen hergestellt, gleich lange belichtet, seit der Herstellung unter Wasser aufbewahrt, nur eben bisher nicht gebraucht. Beide Membranen waren zu dieser Zeit etwa 6 Wochen alt. Vor dem Ingebrauchnehmen ist durch diese Membran auch, wie weiter oben beschrieben, ein elektrischer Strom so lange durchgeschickt worden, bis die Stromstärke sich über eine Stunde nicht mehr verändert hat. Die Kathodenmembranen waren etwa 2 Wochen alte, nicht gebrauchte Kollodiumhülsen.

Es sind insgesamt 6 Menschensera in Parallelversuchen, sowohl mit Chromgelatine-Kollodiumkombination als mit zwei Kollodiummembranen untersucht worden.

Das Blut wurde in trockene, saubere Reagenzgläser aus der Armvene entnommen, 24 Stunden im Eisschrank stehengelassen, dann das Serum abgegossen, zentrifugiert und bis zur Untersuchung ohne jede Zugabe im Eisschrank aufbewahrt. Es sind dann die Sera 1 Stunde lang dialysiert, und zwar sind die Parallelversuche immer an demselben Tage ausgeführt worden, so daß sie bei der Untersuchung immer gleich alt waren. Die Dialysate sind wie weiter oben angegeben verarbeitet.

Tabelle Va.

Menschensera. Versuche mit Chromgelatine-Kollodiumkombination.

Serum Nr.	Gesamteiweiß	Albumin	Relative %	Globulin	Relative %
1	8,488	5,797	68,2	2,691	31,8
2	8,072	5,819	72,0	2,253	28,0
3	7,701	5,338	69,2	2,363	30,8
4	8,094	5,863	72,5	2,231	27,5
5	7,875	5,534	70,2	2,341	29,8
6	7,722	5,600	72,5	2,122	27,5

Tabelle Vb.

Menschensera. Versuche mit zwei Kollodiummembranen.

Serum Nr.	Gesamteiweiß	Albumin	Relative %	Globulin	Relative %	Differenz zwischen Ges.-Eiweiß m. zwei Kollod. u. Chromgelatine-Kollod.-Kombination	%
1	8,510	5,294	62,2	3,216	37,8	0,022	+ 0,3
2	8,231	5,781	70,4	2,450	29,6	0,159	+ 1,9
3	7,875	5,250	66,7	2,625	33,3	0,174	+ 2,2
4	8,334	5,775	69,3	2,559	30,7	0,240	+ 2,9
5	8,072	5,447	67,4	2,625	32,7	0,197	+ 2,4
6	7,831	5,250	67,0	2,581	33,0	0,109	+ 1,4

Die Resultate dieser Versuche sind in den Tabellen Va und Vb enthalten. Es ist nur zu bemerken, daß hier die Gesamteiweißwerte durch Addition der beiden Fraktionen gewonnen worden sind. In der letzten Spalte der Tabelle Vb sind dann noch die Differenzen angeführt, die sich zwischen den Gesamteiweißwerten nach der Dialyse mit Chromgelatine-Kollodiumkombination und mit zwei Kollodiummembranen ergaben.

Es zeigt sich aus diesen Tabellen zweierlei: Erstens, es ist eine in den meisten Fällen beträchtliche Differenz zwischen dem Gesamteiweißwert da, und zwar zeigt sich ein Eiweißverlust bei der Chromgelatine-Kollodiumkombination. Zweitens ist die Ausbeute an Globulin bei den beiden Membrankombinationen verschieden, und zwar ist die Ausbeute bei zwei Kollodiummembranen besser.

Da die Fehler alle gleichgerichtet waren und die bei der Methode übliche Fehlergrenze in den meisten Fällen überschritten, war kaum zu bezweifeln, daß sie durch einen N-Verlust durch die Chromgelatinemembran verursacht worden sind. Um dies jedoch exakt nachweisen zu können, habe ich die Dialyse bei Serum IV, wo die Differenz am größten war, mehrmals wiederholt, dabei das Anodenwasser immer aufgefangen und darin N-Bestimmung gemacht.

Solch ein Versuch sei hier mitgeteilt:

Das Spülwasser des Anodenraumes betrug in einer Stunde 160 ccm. Das Volumen wurde mit destilliertem Wasser auf 200 ccm aufgefüllt und in je 20 ccm der Flüssigkeit N-Bestimmung gemacht. Gleichzeitig sind Leerwertbestimmungen in dem zum Spülen benutzten destillierten Wasser angestellt worden. Der Leerwert betrug in 100 ccm des destillierten Wassers 0,2 mg N, entsprechend 0,66 mg Eiweiß. In den 200 ccm Spülwasser habe ich 0,49 mg N, entsprechend 3,06 mg Eiweiß gefunden. Wenn man den Leerwert, bezogen auf 200 ccm, davon abzieht, bleibt 1,75 mg. Diese Eiweißmenge ist aus 1 ccm Serum verloren gegangen, der Verlust macht also, auf 100 ccm umgerechnet, 175 mg aus. Addiert man diesen Wert zu dem aus den beiden Fraktionen berechneten Gesamteiweißwert, so ergeben sich 8,265 g als Gesamteiweißgehalt des Serums und die Differenz zwischen diesem und dem mit zwei Kollodium gefundenen Gesamteiweißwert beträgt nunmehr bloß 0,069 g (0,83 %), was schon in die übliche Fehlergrenze fällt.

Es wurde der N-Verlust zum Eiweißwerte umgerechnet, da er sich bei Gesamteiweißgehalt als Minus dokumentiert. Es ist jedoch besser, von einem N-Verlust zu sprechen, weil im Anodenwasser mit den üblichen Reaktionen kein Eiweiß nachzuweisen ist, so daß die Form, in der das Nitrogen durch die Membran geht, bisher unentschieden ist. Man könnte denken, daß aus der Membran selbst NH_4 auswandert und den N-Gehalt des Anodenwassers verursacht; wäre es aber der Fall, so sollte das NH_4 als positives Ion unter dem Einfluß des Stromes durch die Mittelflüssigkeit zur Kathode wandern und könnte höchstens im Kathodenwasser erscheinen. Aus demselben Grunde kann man auch daran nicht denken, daß vom Eiweiß durch den Strom NH_4 abgespalten wird, sondern es ist am wahrscheinlichsten, daß die Membran, und zwar aller Wahrscheinlichkeit nach erst mit der Zeit für Eiweißabbauprodukte, die entweder schon im Serum als Rest-N-Körper präformiert sind, oder aber unter Einwirkung des Stromes erst während der E. D. gebildet werden, durchlässig wird.

Um festzustellen, ob diese Durchlässigkeit nur eine individuelle Eigenschaft der hier gebrauchten Membran ist oder aber mit dem Altern der Chromgelatinemembranen im allgemeinen zusammenhängt, ist dasselbe Serum auch mit der in den vorherigen Versuchen gebrauchten Membran dialysiert worden, und dabei ergaben sich folgende Werte: Gesamteiweiß 8,006, Albumin 5,644, relative % 70,5, Globulin 2,363, relative % 29,5. Differenz zwischen Gesamteiweiß mit zwei Kollodium und Chromgelatine-Kollodium $0,227 = 2,85\%$. Der Verlust ist also bei dieser Membran genau so groß wie bei der anderen, und das spricht dafür, daß der N-Verlust eine Alterserscheinung bei den Chromgelatinemembranen ist.

Das Anodenwasser habe ich auch beim zwei Kollodiumsystem untersucht, da war aber kein N-Verlust nachzuweisen.

Diese Untersuchungen erweisen aber auch, daß mit der angegebenen Methode nicht nur die Mittelflüssigkeit, sondern sowohl das Anoden- als das Kathodenwasser gut analysiert werden kann. Das Spülwasser kann doch getrennt aufgefangen und, da die Flüssigkeitsmengen nicht zu groß sind, die Analyse bequem darin ausgeführt werden.

Die eigentliche Frage aber, die diese Untersuchungen entscheiden sollten, war die, welche Membrankombination von den beiden untersuchten am besten anzuwenden ist. Und wenn wir jetzt auf Grund der mitgeteilten Versuchsergebnisse die Leistungsfähigkeit der beiden Membransysteme einander gegenüberstellen, so ergibt sich folgendes Bild:

1. Bei Chromgelatine-Kollodiumkombination:

a) Die Reaktionsschwankungen bewegen sich zwischen der Anfangsreaktion des Serums und dem I. P. des Globulins.

b) Die Entmineralisation erreicht einen etwas höheren Wert und vollzieht sich rascher als bei zwei Kollodiummembranen.

c) Die Niederschlagsbildung erreicht ihr Maximum in den ersten 40 Minuten; die Menge des gebildeten Niederschlags ist bei frischen Membranen gleich der mit zwei Kollodiummembranen erreichbaren. Nach einer Zeit, etwa 4 Wochen, zeigt sich aber bei dieser Kombination ein mit der Zeit zunehmender N-Verlust, dabei wird die Ausbeute an Globulin auch vermindert.

d) Die Herstellung der Chromgelatinemembran ist schwieriger und dauert auch länger.

2. Bei zwei Kollodiummembranen:

a) Die Reaktion der Mittelflüssigkeit wird am Anfang der E. D. stark sauer, nähert sich dann allmählich dem I. P. des Globulins.

b) Die Entmineralisation geschieht etwas langsamer als bei dem Chromgelatine-Kollodiumsystem, erreicht nicht ganz so hohe Werte wie bei diesem, die Endleitfähigkeitswerte sind jedoch bei beiden Systemen gleicher Größenordnung.

c) Die Niederschlagsbildung erreicht, zwar auf anderem Wege, denselben Betrag, wie bei dem ersten System, dabei war bei den bisher gebrauchten Membranen kein N-Verlust zu beobachten.

d) *Die Herstellung der Membranen ist einfach, und sie sind nach der Herstellung sofort brauchbar.*

Auf Grund dieser Überlegungen möchte ich für den praktischen Gebrauch doch das aus zwei Kollodiummembranen bestehende System beibehalten, besonders weil bei der angegebenen Methode in erster Linie die praktischen Gesichtspunkte, wie die Verlässlichkeit, Haltbarkeit der Membran, die Einfachheit der Herstellung in Betracht kommen, und dann weiter, weil die Menge der gebildeten Niederschläge mit dem Alter der Kollodiummembran nicht so zu schwanken scheint, wie bei der Chromgelatine-Kollodiumkombination.

Ich möchte mit einigen Worten nur noch auf die praktische Anwendung der Methode und auf die Bedeutung ähnlich ausgeführter Versuche hinweisen.

Die Methode ist in erster Linie zur Fraktionierung der Serumeiweißkörper und zur quantitativen Trennung des dabei erhaltenen Niederschlages von dem in Lösung bleibenden Teile ausgearbeitet worden. Dieses Ziel kann man mit der Methode, wie ich es bewiesen zu haben glaube, mit einer Genauigkeit erreichen, die den praktischen Anforderungen vollkommen entspricht. Daneben kann sie aber überall dort angewendet werden, wo es sich um die elektrolytische Reinigung von kleinen Flüssigkeitsmengen handelt, besonders wenn es dabei auf die quantitative Zurückgewinnung der dialysierten Flüssigkeit ankommt. Außer der Mittelflüssigkeit kann man weiter mit dem Apparat das Anoden- und Kathodenwasser bequem analysieren.

Was die klinische Bedeutung ähnlicher Untersuchungen anlangt, so muß auf die sich immer vermehrenden Untersuchungen hingewiesen werden, die bei den verschiedensten Krankheiten, wie Lues, Tuberkulose, bösartige Geschwülste, Infektionskrankheiten, eine Veränderung in der kolloidalen Struktur der Blutflüssigkeit ergaben. Des weiteren soll noch die immunbiologische Bedeutung erwähnt werden, die in der neueren Zeit den Globulinen beigemessen wird.

Ich will das Gesagte nur mit einem Beispiel illustrieren:

Zeichnet man die in verschiedenen Stadien der E. D. erhaltenen Albumin- und Globulinwerte kurvenmäßig auf, wie es in Abb. 10 und 11

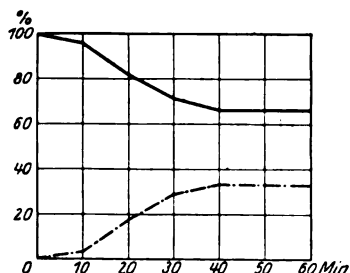


Abb. 10.

Gegenseitiges Verhalten d. Serumeiweißfraktionen während der E. D. bei Chromgelatine-Kolloidumkombination.

— Albumin.
- - - Globulin.

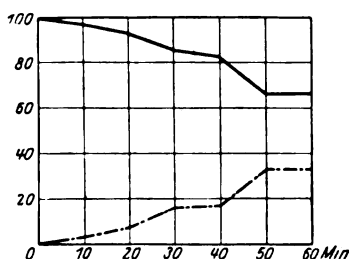


Abb. 11.

Gegenseitiges Verhalten d. Serumeiweißfraktionen während der E. D. bei zwei Kolloidiummembranen.

— Albumin.
- - - Globulin.

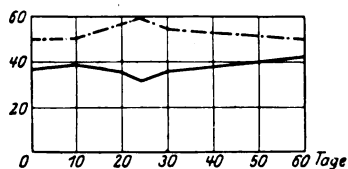


Abb. 12.

Gegenseitiges Verhalten der Serumeiweißfraktionen während des Ablaufs der Krankheit bei einem septisch erkrankten Individuum.

— Albumin. - - - Globulin.

geschehen ist, so erhält man zwei Kurven, die genau symmetrisch verlaufen und daher das Spiegelbild voneinander sind. Untersucht man nun bei einem septisch erkrankten Individuum während des Ablaufs der Krankheit wiederholt das Verhalten der Eiweißfraktionen im Blute, wie wir es mit *Rusznýák*, allerdings mit einer anderen Methodik (Nephelometrie nach *Rusznýák*), gemacht haben (7), so erhält man vollkommen ähnliche Kurven (Abb. 12), nur mit dem Unterschied, daß die Globulinwerte während der Krankheit viel höher liegen als unter normalen Verhältnissen, sie über treffen sogar stark die Albuminwerte, der Kurvenverlauf der beiden Fraktionen zeigt aber ebenso eine gegenseitige Abhängigkeit voneinander, wie während der E. D.

Zusammenfassung.

1. Es wird ein Apparat zur quantitativen Trennung der Serum-eiweißfraktionen durch Elektrodialyse angegeben, dessen Prinzip ist, daß die Elektrodialyse in zentrifugenglasförmigen Membranen ausgeführt wird, die zentrifugierbar sind und dadurch eine schnelle und quantitative Trennung des Globulinniederschlags vom Albumin ermöglichen. Zur Untersuchung ist 1 ccm Serum nötig, kann daher bei den unter klinischen Verhältnissen zur Verfügung stehenden Flüssigkeitsmengen angewendet werden und ist besonders zu Serienuntersuchungen geeignet. Es wird die Methode der Trennung beschrieben.

2. Es wird gezeigt, daß das Eiweiß nach der Dialyse quantitativ zurückzubekommen ist und dabei beträgt der maximale Versuchsfehler 2 %, in den meisten Fällen bewegt er sich sogar unter 1 %.

3. Es sind zwei Membrankombinationen für die quantitative Anwendung ausprobiert worden, die Chromgelatine-Kollodiumkombination und zwei Kollodiummembranen. Es ist der Vorgang der E. D. hinsichtlich Reaktionsänderung, Entmineralisation und Niederschlagsbildung bei beiden Membrankombinationen in Parallelversuchen verfolgt worden.

4. Die Reaktionsänderungen bewegen sich bei Chromgelatine-Kollodiumkombination zwischen der Anfangsreaktion des verdünnten Serums und dem I. P. des Globulins. Bei zwei Kollodium wird die Reaktion am Anfang der Dialyse stark sauer, nähert sich dann dem I. P. des Globulins, den sie meistens etwas überschreitet.

5. Die Entmineralisation zeigt einen anfänglichen, ziemlich steilen und gleichmäßigen Abfall, dann einen Stillstand und dann zuletzt wieder eine stärkere Abnahme. Der Verlauf der Leitfähigkeitskurven ist bei beiden Kombinationen gleichartig, die Entmineralisation geht jedoch beim Chromgelatine-Kollodiumsystem etwas rascher vor sich, als bei zwei Kollodiummembranen.

6. Die Niederschlagskurve ist bei Chromgelatine-Kollodium eine gleichmäßige und erreicht ihr Maximum nach 40 Minuten, während sie bei zwei Kollodium dort, wo die Leitfähigkeitskurve ein Plateau zeigt, ebenfalls einen Stillstand aufweist. Der Höhepunkt der Nieder-

schlagsbildung wird hier nach 50 Minuten erreicht, der Endzustand ist jedoch, frische Membranen vorausgesetzt, bei beiden Systemen der gleiche.

7. Der Vorgang der E. D. wird auf Grund des Ganges der Entmineralisation in drei Phasen eingeteilt. In der ersten Phase werden die gar nicht oder nur lose an Eiweiß gebundenen Elektrolyte entfernt. In dieser Phase fällt ein Teil, etwa 50 % des Niederschlages aus. In der zweiten Phase werden die mit dem Eiweiß eng verbundenen Kristalloide dem Serum entzogen. Dieses Stadium fließt bei Chromgelatine-Kollodium hinsichtlich der Niederschlagsbildung mit dem ersten und dritten zusammen und ist nur an der Leitfähigkeitskurve bemerkbar, wogegen bei zwei Kollodiummembranen die Niederschlagskurve auch ein in der Mitte liegendes Plateau aufweist, dem dann noch in diesem Stadium eine starke Zunahme des Niederschlages folgt. In der dritten Phase endlich fallen die Leitfähigkeitskurven wieder und die Niederschlagsmenge bleibt von nun an konstant.

8. Es konnte in Versuchen mit Menschensera der Einfluß des Alterns auf Chromgelatinemembranen hinsichtlich der N-Durchlässigkeit gezeigt werden. Es konnte ein Teil des Stickstoffs im Anodenwasser wiedergefunden werden.

9. Für quantitative Untersuchungen wird die aus zwei Kollodiummembranen bestehende Anordnung empfohlen, weil die Herstellung derselben einfacher und die Verlässlichkeit größer ist als bei Chromgelatinemembranen.

10. Es wird auf die praktische Anwendbarkeit der Methode hingewiesen.

Die Untersuchungen sind unter der Leitung des Herrn Prof. *Rona* ausgeführt worden; ihm sowie Herrn Dr. *Kleinmann* sei auch an dieser Stelle mein verbindlichster Dank für ihr reges Interesse und Förderung bei der Arbeit ausgesprochen.

Die Ausführung der Untersuchungen hat mir eine Unterstützung seitens der ungarischen Regierung durch das Collegium Hungaricum in Berlin ermöglicht.

Literatur.

Eine vollständige chronologische Zusammenstellung der die E. D. betreffenden Literatur siehe bei *Dhéré*, Kolloidzeitschr. **41**, H. 3/4, 1927.

1) *Rusznýák*, diese Zeitschr. **141**, 479, 1923. — 2) *Reiner*, Kolloidzeitschr. **40**, 2, 123, 1926. — 3) *Pauli*, Klin. Wochenschr. 1924, 3. Jahrg., Nr. 1. — 4) *Ettisch-Beck*, diese Zeitschr. **171**, 443, 1926. — 5) *Tóth*, Arch. f. Gyn. **123**, 2 bis 3, 1925. — 6) *Derselbe*, ebendasselbst **127**, 2 bis 3, 1926.

**Untersuchungen
über die Bedeutung der ζ -Potentiale für elektroosmotische
Flüssigkeitsüberführung durch Kollodiummembranen¹.**

Ein Versuch zu einer neuen Theorie der anomalen Osmose.

Von

P. J. Jurišić (Zagreb).

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Charité,
Berlin.)

(Eingegangen am 19. Juli 1927.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Da ich in meiner letzten Arbeit² über die Einwirkung von H' und OH' auf die elektroosmotische Flüssigkeitsüberführung durch Kollodiummembranen zeigen konnte, daß zwischen der *Richtung* bzw. der *Geschwindigkeit* des Flüssigkeitstransports und der Höhe und Richtung der abgeleiteten Membranpotentiale keine direkte Beziehungen bestehen — was aber, wenn die vorherrschende Auffassung zu Recht bestünde, bezüglich der Überführungsgeschwindigkeit der Fall sein müßte —, habe ich Untersuchungen vorgenommen, um die Rolle des elektrokinetischen Potentials als zweiten Faktors, der neben dem Membranpotential bei den erwähnten Erscheinungen in Betracht kommt, auf seine Bedeutung eines richtungsbestimmenden Faktors und seine *aktive* Rolle bei der elektroosmotischen Flüssigkeitsüberführung genauer zu verfolgen. Bei den üblichen Versuchen über die elektroosmotische Flüssigkeitsüberführung durch Kollodiummembranen werden die Erscheinungen durch rein osmotische Komponenten der verwendeten Elektrolytlösungen in positivem oder negativem Sinne je nach der Stärke der Elektrolytkonzentrationen mehr oder weniger überlagert. Andererseits wieder wurden bisher die Verhältnisse und Bedingungen der elektrokinetischen Potentiale in der Membranpore allzu einfach und einseitig aufgefaßt. *Mein Bestreben war, die von mir*

¹ Ausgeführt mit Hilfe eines Rockefellerstipendiums. Ich spreche dafür der Rockefellerstiftung auch an dieser Stelle meinen innigsten Dank aus.

² P. J. Jurišić, diese Zeitschr. 185. 423. 1927.

aufgeworfenen Fragen an Systemen zu studieren, wo der Flüssigkeits-transport ausschließlich auf elektroosmotischem Wege stattfindet. Wie weiter unten noch ausführlicher dargelegt wird, bieten diese Systeme den Vorteil, bei Konstanthaltung der Säure- bzw. Laugekonzentrationen auf beiden Seiten der Membran und durch Variieren der Bedingungen der ζ -Potentiale in den Membranporen die Rolle der letzteren für die von mir aufgeworfenen Fragen direkt zu demonstrieren. Außerdem wird man bei den in dieser Arbeit verwendeten Kombinationen Systeme finden, die in rein physiologischer Hinsicht von Bedeutung sind. Bezüglich der Methodik verweise ich auf meine früheren Untersuchungen¹.

Nach der Perrinschen Formel ist die Geschwindigkeit der elektroosmotischen Flüssigkeitsüberführung durch den Ausdruck $v = \frac{q \zeta E D}{4 \pi \eta}$ bestimmt, wo E die angelegte elektromotorische Kraft — in unserem Falle also das Membranpotential —, D die Dielektrizitätskonstante, q den Flüssigkeitsquerschnitt, η die Konstante der inneren Reibung und ζ das elektrokinetische Potential bedeutet. Die Richtung dieser Flüssigkeitsüberführung ist durch die Richtung des elektrokinetischen Potentials gegeben. Bartell² hat auf Grund seiner Versuche an Porzellan und Goldschlägerhaut die Regel aufgestellt, daß auch die Richtung der Flüssigkeitsüberführung durch Membranen, je nach den Bedingungen des ζ -Potentials in bezug auf das Membranpotential anodische bzw. kathodische Wanderung zeigt.

Dies gilt nun für jenen Fall, wenn ζ -Potentiale in der Pore dem Betrage nach äquipotential sind. In meinen Versuchen aber, obwohl die Flüssigkeitssäule in der Pore immer positiv geladen ist, findet man je nach den Versuchsbedingungen eine anodische oder kathodische Flüssigkeitsüberführung. Wie dies zu verstehen ist, ist aus weiteren Ausführungen ersichtlich.

Den Ausgangspunkt meiner Untersuchungen bildete die Kombination: n/x HCl — Kollodiummembran — n/x KOH. In diesem System findet der Flüssigkeitstransport in der Richtung $\text{KOH} \rightarrow \text{HCl}$ statt, und die Geschwindigkeit desselben ist den verwendeten Elektrolytkonzentrationen symbat. Die osmotischen Komponenten heben sich gegenseitig auf, die Flüssigkeitsüberführung findet also nur elektroosmotisch statt. Abb. 1 illustriert schematisch die bei dieser Versuchsanordnung in Betracht kommenden physikalisch-chemischen Momente.

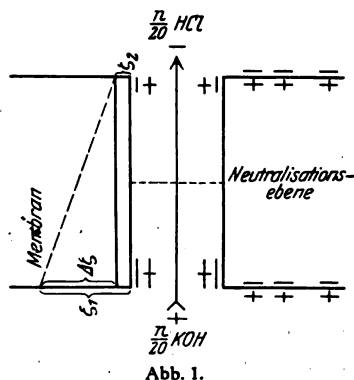


Abb. 1.

¹ P. J. Jurišić, Physik. Zeitschr. 27, 1926.

² Bartell, Proc. Nat. Acad., N. S. A., 6, 1920.

In der Neutralisationsebene tritt Säure und Lauge zusammen. Von dieser Ebene der Säure bzw. der Lauge zu sind die Bedingungen der ζ -Potentiale verschieden. Auf der Säureseite findet infolge der Adsorption von H^+ eine Verminderung, auf der Laugenseite dagegen durch Adsorption von OH^- eine Vergrößerung der negativen Aufladung der Kolloidummembran statt. Da aber Kolloidium *stets*¹ seine negative Ladung beibehält, ist die *Richtung* der elektrokinetischen Potentiale bei allen Kombinationen dieselbe, d. i. die Flüssigkeitssäule in der Membranpore ist stets positiv aufgeladen. *Es besteht bloß eine Differenz im Betrage der ζ -Potentiale von der Neutralisationsebene der Säure bzw. der Lauge zu.* Ich bezeichne diese Differenz mit $\Delta\zeta$. Das elektrokinetische Potential beim Porenende an der Laugenseite wird mit ξ_1 , jenes an der Säureseite mit ξ_2 bezeichnet. Es ist selbstverständlich, daß hier $\xi_1 > \xi_2$ ist und daß zwischen den beiden die Beziehung: $\Delta\zeta = \xi_1 - \xi_2$ besteht. Es soll nun gezeigt werden, daß in allen Fällen der elektroosmotischen Flüssigkeitsüberführung durch Kolloidummembranen die Richtung des Flüssigkeitstransports von der Richtung von $\Delta\zeta$ — ohne Rücksicht auf die Richtung der abgeleiteten Membranpotentiale — abhängt, d. h., daß die Richtung des Flüssigkeitstransports im von größerem zu kleinerem ζ -Potential stattfindet. Nehmen wir zu diesem Zwecke verschiedene Systemkombinationen.

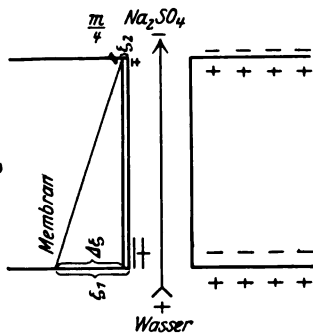


Abb. 2.

Abb. 2 stellt schematisch die physikalisch-chemischen Momente bei der ganz gewöhnlichen Kombination Salzlösung — Kolloidummembran — Wasser dar. In allen bisherigen Untersuchungen über die Theorie der anomalen Osmose wurde die wichtige Tatsache übersehen, daß in der Membranpore ein Diffusionsgefälle vorhanden ist, d. i., daß man in derselben an beiden Phasengrenzen *dem Betrage* nach mit verschiedenen ζ -Potentialen zu

rechnen hat, daß also ein $\Delta\zeta$ vorhanden ist. *Loeb*² hat gezeigt, daß das elektrokinetische Potential der Kolloidiumteilchen in Wasser 25 Millivolt beträgt und daß dasselbe mit *wachsender* Konzentration in wässrigen Salzlösungen *sinkt*. Bei einer $m/8$ Na_2SO_4 -Lösung beträgt das ζ -Potential nach *Loeb* 1,5 Millivolt. In unserem Beispiel haben wir in der Membranpore in der Richtung auf das Wasser zu

¹ Vgl. *L. Michaelis*, Wasserstoffionenkonzentration, S. 197 ff. Berlin, Springer, 1922.

² Zit. nach *R. Höber*, Physik. Chem., 1926, S. 160.

mit sinkender Salzkonzentration zu rechnen, die *elektroosmotische Flüssigkeitsüberführung* muß also in der angegebenen Richtung stattfinden. Selbstverständlich kann man die rein osmotische Komponente der verwendeten Salzlösung durch Zugabe einer isotonischen Menge z. B. von Zucker ins Wasser als Außenflüssigkeit kompensieren. Ganz identisch sind die Verhältnisse, welche in der Abb. 3 dargestellt sind.

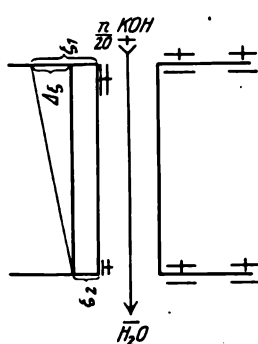


Abb. 3.

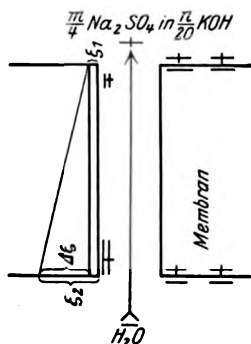


Abb. 4.

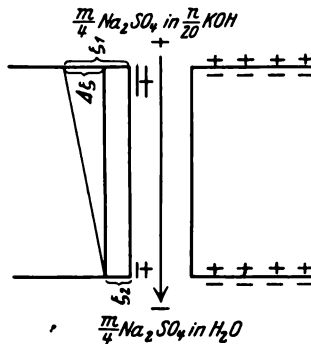


Abb. 5.

Hier haben wir einen Fall der negativen Osmose. In der Membranpore ist wieder ein Diffusionsgefälle von KOH. Stärkere Laugenkonzentrationen laden Kollodiummembranen stärker negativ auf. $\Delta\xi$ verläuft also von Lauge in der Richtung zu Wasser¹. In dieser Richtung findet auch der elektroosmotische Flüssigkeitsstrom statt. Nehmen wir nun eine Systemkombination wie in Abb. 4. Hier ist die Richtung der aus der Außenflüssigkeit und der Innenlösung abgeleiteten Potentialdifferenzen dieselbe wie in Abb. 3, jedoch findet der Flüssigkeitstransport in der entgegengesetzten Richtung statt.

Die *entladende* Wirkung der verwendeten Salzkonzentrationen ist hier zu groß, so daß das ζ -Potential dem Wasser zu größer ist. $\Delta\xi$ verläuft hier in der entgegengesetzten Richtung als in Abb. 3, deswegen ist auch die Richtung des Flüssigkeitsstromes entgegengesetzt.

Nun ist die in Abb. 5 dargestellte Kombination besonders interessant.

¹ Selbstverständlich ist die Geschwindigkeit der Flüssigkeitsüberführung von Hülse zu Hülse verschieden. Ich habe die Beobachtung gemacht, daß dünne Kollodiumhülsen meistens keine negative Osmose zeigen. Offenbar tritt hier negative Osmose — ceteris paribus — bei einer bestimmten Länge der Pore auf, wodurch die Bildung von einem, dem Betrage nach, größeren $\Delta\xi$ ermöglicht wird.

Hier ist auf der Laugenseite wieder das ζ -Potential größer als auf der gegenüberliegenden Seite der wässrigen Salzlösung. $\Delta\zeta$ hat wieder dieselbe Richtung wie in der Abb. 3, es muß also wieder zu einer negativen Osmose kommen. Aus Abb. 6 ist ersichtlich, daß mit sinkender Konzentration der wässrigen Salzlösung zwischen m/32 und m/64 die Umkehr der Richtung der Flüssigkeitsüberführung stattfindet.

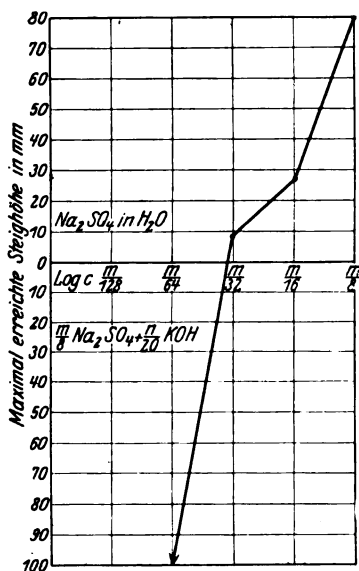


Abb. 6.

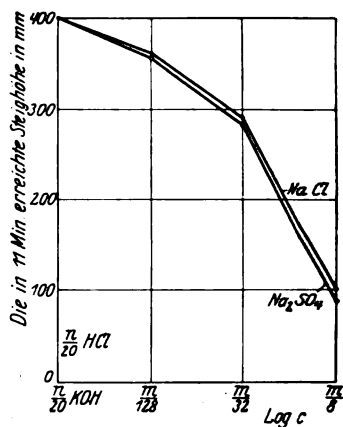


Abb. 7.

Nun aber wird gezeigt, daß die Geschwindigkeit des elektro-osmotischen Flüssigkeitstransports auch mit $\Delta\zeta$ symbat ist. Dies illustriert die in der Abb. 7 dargestellte Kombination. In diesem Versuche befindet sich auf der einen Seite der Membran n/20 HCl, auf der anderen n/20 KOH. Nun werden zu beiden Seiten gleiche Salzkonzentrationen zugegeben. Man sieht, daß die Geschwindigkeit der Flüssigkeitsüberführung mit sinkender Salzkonzentration zunimmt. Offenbar auch deswegen, weil $\Delta\zeta$ im System n/20 HCl—Kollodiummembran—n/20 KOH seinen größten Wert hat. Dieses letzte System ist noch außerdem interessant, da es als eine Analogie für die Resorptionsarbeit gelten kann.

Denn bekanntlich kann man im Stoffwechselgetriebe bei den Organismen zwei Organsysteme bzw. Vorrichtungen unterscheiden, die einerseits die Aufnahme der verarbeiteten Nahrungsstoffe vermitteln, andererseits wieder der Beseitigung der Dissimilationsprodukte dienen. Und trotz aller Verschiedenheiten, welche zwischen diesen Organen, sei es in morphologischer Hinsicht, sei es in der Art und Richtung der physiologischen Funktion, herrschen können, haben dieselben eine wichtige physikalisch-

chemische Charakteristik gemeinsam: sie sind imstande, Konzentrationsarbeit zu leisten. Nur beispielshalber sei hier der bekannte *Reidsche* Versuch erwähnt, wo durch eine als Trennungsmembran zwischen zwei „physiologischen“ NaCl-Lösungen gespannte Froschhaut dennoch eine gerichtete Flüssigkeitsüberführung stattfindet, und zwar von Außen- zur Innenseite der Froschhaut. Es hat natürlich nicht an Untersuchungen gefehlt, nach den hierzu notwendigen Betriebskräften zu forschen. Ich verweise diesbezüglich auf die ganz vorzügliche Zusammenstellung bei *Höber*¹. Nun aber sehen wir, daß auch in unseren, in den Abb. 1 und 7 dargestellten Systemen ebenfalls bei der beiderseitigen Isotonie Konzentrationsarbeit geleistet wird. Da aber von den beiden Seiten der Froschhaut ebenfalls Potentiale ableitbar sind, wäre es denkbar, daß hier analoge Erscheinungen, wie bei unserem Modellversuch, vorliegen. Wie sich dies aber bei der Leistung von Konzentrationsarbeit im Falle der Resorption tatsächlich verhält, werde ich in einer besonderen Arbeit berichten.

Wenn meine Überlegungen richtig sind, so wird sich folgendes ergeben. Füllt man die Kollodiumhülle z. B. mit $n/20$ HCl + m/x Na_2SO_4 und verwendet man als Außenflüssigkeit eine Lösung von m/x Na_2SO_4 , so muß sich eine stärkere Salzkonzentration ergeben, wo die Verminderung von elektrokinetischem Potential auf der Säureseite ziemlich gleich sein wird jener Erniedrigung, die durch die Salzlösung als Außenflüssigkeit verursacht wird. In diesem Falle werden ξ_1 und ξ_2 sehr klein und $\Delta\xi$ praktisch gleich Null sein. Verkleinern wir nun die Konzentrationen des Salzes auf beiden Seiten, so wird mit wachsendem x die Entladung auf der Seite der Außenflüssigkeit immer kleiner werden als die Entladung auf der Säureseite. Es muß also mit wachsendem x in unserem System $\Delta\xi$ immer größer werden. Nun aber kommt bei unserer Kombination immer die rein osmotische Komponente von $n/20$ HCl in Betracht. Sie ist aber praktisch gleich Null, denn in der Kombination: $n/20$ HCl + $m/4$ Na_2SO_4 - Kollodiummembran - $m/4$ Na_2SO_4 findet man keinen Anstieg während der Versuchsdauer. Wir finden also in dieser letzten Kombination trotz des bestehenden Membranpotentials keine Flüssigkeitsüberführung, weil die ζ -Potentiale praktisch fehlen. Aus der Abb. 8 ist ersichtlich, daß mit wachsendem $\Delta\xi$ auch die in 10 Minuten erreichte Steighöhe größer wird.

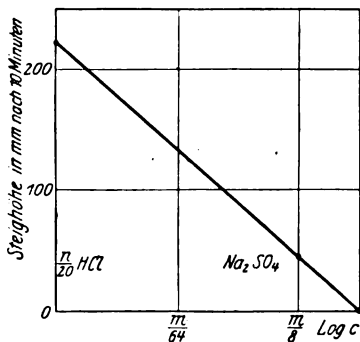


Abb. 8.

¹ R. Höber, l. c., S. 787 ff.

Abb. 9 stellt die bei diesem Versuch abgeleiteten Potentialdifferenzen graphisch dar.

Wir sehen, daß bei gleicher Richtung des Membranpotentials der Flüssigkeitstransport je nach den Bedingungen in wechselnder Richtung stattfindet. Die einzige Größe, deren quantitativer Unterschied immer der Strömungsrichtung des Wassers symbar geht, ist der Unterschied der ξ -Potentiale in der Pore ($\Delta\xi$), mit anderen Worten, in allen angestellten Versuchen fließt die Flüssigkeit in der Pore von dem Orte des höheren, zu dem Orte des niedrigeren ξ -Potentials.

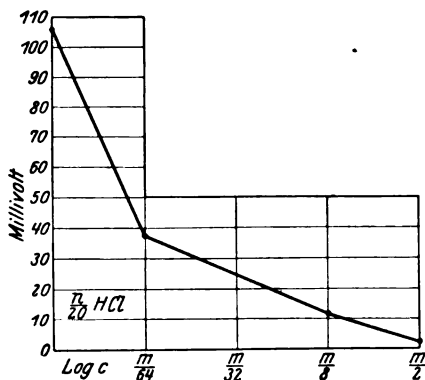


Abb. 9.

Zum Schluß erwähne ich noch eine Kombination, die ebenfalls ein physiologisches Interesse beanspruchen kann. Ich habe gezeigt, daß H-Ionen mit sinkendem p_H der Lösung die Flüssigkeitsüberführung im Steigrohr hemmen, wenn p_H der Außenflüssigkeit auf der sauren Seite liegt. Hat die Außenflüssigkeit aber eine alkalische Reaktion, so wächst die Geschwindigkeit des Flüssigkeitstransports. Die Verhältnisse sind in der Abb. 8 dargestellt. Die Pfeilrichtung bedeutet die Richtung und die Größe des Flüssigkeitstransports. Von unserem Standpunkt aus ist die Richtung dieses Flüssigkeitsstromes ohne weiteres klar. Physiologisch betrachtet, findet man analoge Verhältnisse bei akuten warmen Abszessen¹. Im Zentralherd der Entzündung haben wir es nicht nur mit einer Erhöhung der molekularen Salzkonzentration, sondern auch mit einer Hyperionie der H-Ionen zu tun. Diese dekompenzierte Azidose würde also auf Grund der in der Abb. 10 in b dargestellten Verhältnisse trotz der Erhöhung der molekularen Salzkonzentration in Wirklichkeit eine Hypotonie schaffen, wenn der Bereich des latenten Ödems ein p_H z. B. von destilliertem Wasser hätte. Wir

¹ Vgl. darüber H. Schade, Die physikalische Chemie in der inneren Medizin, S. 96 bis 104. Dresden-Leipzig 1923.

haben Grund genug anzunehmen, daß auch hier Bedingungen für eine elektroosmotische Flüssigkeitsbewegung gegeben sind. Eine Erhöhung des Flüssigkeitsstromes würde in diesem Falle durch die *alkalische* Reaktion des umgebenden Gewebes beschleunigt werden.

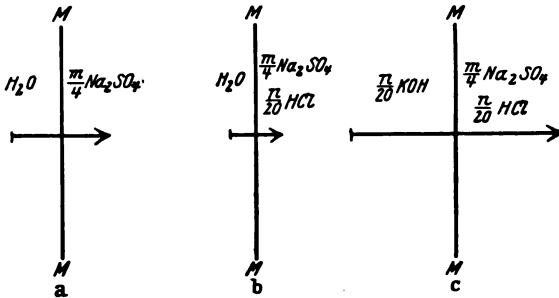


Abb. 10.

Zum Schluß betrachte ich es als eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. *P. Rona* für die überaus liebenswürdige Aufnahme in seiner Abteilung und das rege Interesse, welches er meinen Untersuchungen dargebracht hat, auch an dieser Stelle meinen innigsten Dank auszusprechen. Dank schulde ich auch Herrn Prof. *M. Miculicich* (Zagreb) und Herrn Prof. *Boris Zarnik* (Zagreb) dafür, daß sie mir neuerdings zu einem Rockefellerstipendium verholfen haben.

Zur Analyse der Insulinwirkung.

I. Mitteilung:

Die Hemmung der Phosphatausscheidung durch Insulin.

Von

H. K. Barrenscheen und Robert Berger.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 1. August 1927.)

Zu den sinnfälligsten Wirkungen des Insulins gehört neben der Senkung des Blutzuckers auch der Einfluß auf den Phosphatstoffwechsel, der in gleicher Weise nach parenteraler Injektion von Insulin zu beobachten ist, wie bei physiologischer Aktivierung des Inselorgans durch Kohlehydratzufuhr. Das Absinken des anorganischen Phosphors im Blute wird im allgemeinen als ein Ausdruck dafür angesehen, daß das Phosphat in den intermediären Kohlehydratstoffwechsel einbezogen wird und so aus der Blutbahn verschwindet. Wir sind uns dabei wohl bewußt, daß die experimentelle Grundlage für eine solche Anschauung eigentlich fehlt. Sind wir doch über das Schicksal des Kohlehydrats, das unter Insulinwirkung scheinbar verschwindet, ganz im unklaren und können über die hypothetische Kohlehydrat-phosphorsäureverbindung nur Mutmaßungen äußern, die ihre Begründung vorläufig noch in Analogien zu anderen intermediären Stoffwechselvorgängen haben, wie z. B. dem Betriebsstoffwechsel der Muskulatur, für den die innigen Beziehungen zwischen Kohlehydrat und Phosphat einwandfrei erwiesen sind. Scheinbar leichter zu erklären ist das Absinken der Phosphatausscheidung durch den Harn. Durch die Annahme, daß auch das Phosphat für seine Ausscheidung durch den Harn eine Schwelle besitzt, die nach den Untersuchungen von Adolf¹ mit 2,9 mg-% anzunehmen ist, wäre es ohne weiteres verständlich, daß beim Absinken des Phosphorgehalts im Blute parallel damit die Ausscheidung im Harn sinkt und eventuell sogar bei Unterschreitung der Schwelle auf Null herabgeht. Ganz so einfach ist jedoch

¹ Amer. Journ. of Physiol. 74, 93, 1925.

die Sache nicht. Aus experimentellen Daten läßt sich nämlich zeigen, daß hier die Verhältnisse komplizierter liegen müssen, als es von vornherein den Anschein hat.

Wir wollen zu diesem Zwecke aus eigenen, bereits früher veröffentlichten Arbeiten je ein Beispiel von Blut- und Harnphosphatwerten nach peroraler und intravenöser Glucosezufuhr, sowie nach Injektion von Insulin beim nüchternen Normalen näher analysieren. So finden wir in einem Falle¹ nach 60 g Glucose per os folgende Verhältnisse (die für den anorganischen Phosphor im Blute angegebenen Zahlen sind als Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen berechnet).

	Anorganischer P im Blute mg-%	P im Harn mg	Blutausgangswert = 100	Harnaussgangswert = 100
Nüchtern . . .	3,95	34,3	100	100
1 Std.	3,57	9,9	90,4	28,9
2 "	2,85	5,6	72,2	16,3
3 "	3,70	1,4	93,7	4,08
4 "	3,58	3,8	90,6	11,1

Noch deutlicher werden die Differenzen, wenn wir die Ausgangswerte für den Blut- und Harnphosphor gleich 100 setzen und das Absinken in Prozenten des Ausgangswertes berechnen, wie es die dritte und vierte Zahlenreihe zeigen.

Die nachstehenden Zahlen, die einem Fall² von intravenöser Injektion von 30 g Glucose entnommen sind, zeigen analoge Verhältnisse.

	Anorganischer P im Blute mg-%	P im Harn mg	Blutausgangswert = 100	Harnaussgangswert = 100
Nüchtern . . .	2,67	14,75	100	100
1 Std.	2,06	9,95	77,2	67,5
2 "	2,46	4,08	92,2	27,7

Schließlich sei noch ein Beispiel³ der Insulinwirkung beim nüchternen Normalen angeführt.

	Anorganischer P im Blute mg-%	P im Harn mg	Blutausgangswert = 100	Harnaussgangswert = 100
Nüchtern . . .	3,59	15,1	100	100
1 Std.	3,35	9,0	93,3	59,6
2 "	3,41	5,0	95	33
3 "	3,41	6,0	95	39,8

Wir könnten dieses Material aus unseren Untersuchungen beliebig vermehren, wollen uns jedoch mit dieser Zusammenstellung begnügen. Eines geht daraus einwandfrei hervor, daß mit der Annahme einer Nieren-

¹ Diese Zeitschr. 177, 52 und 57, 1926, Tabelle I und II, Fall 11.

² Ebendaselbst 177, 62, 1926, Tabelle IV, Versuch 31.

³ Ebendaselbst 177, 84, 1926, Tabelle II, Versuch 48.

schwelle die Hemmung der Sekretion des Phosphats sich schwer erklären läßt. Wie sämtliche Beispiele zeigen, sinkt nämlich die Phosphorausscheidung im Harn noch immer beträchtlich ab, während der Durchschnittswert für den Phosphor im Blute sein Minimum schon längst überschritten hat und dem Ausgangswert wieder zustrebt. Die Zahlen von den Fällen mit peroraler und intravenöser Glucosezufuhr zeigen dies besonders deutlich. Die Inkongruenz zwischen dem Absinken des Blutphosphors und dem Absinken der Phosphatausscheidung im Harn geht besonders deutlich aus dem Beispiel nach Insulininjektion hervor. Will man hier die herrschende Lehre von der Nierenschwelle zur Erklärung heranziehen, so müßte man zu der Annahme greifen, daß sich unter der Einwirkung von Insulin entweder die Schwelle für die Phosphatausscheidung dauernd verschiebt oder die für den Sekretionsmechanismus charakteristische Konstante, eventuell beide Größen gleichzeitig, sich von Stunde zu Stunde ändern. Die Verlegenheit, welche gerade die Ausscheidung des Phosphats unter Insulin- und Kohlehydratzufuhr der Theorie der Harnsekretion bereitet, betont auch *Cushny*¹ in der neuesten Auflage seiner Monographie.

Gegenüber diesen Schwierigkeiten, welche der herrschenden Ansicht bei der Erklärung dieser Hemmung der Phosphatausscheidung erwachsen, bietet die in neuerer Zeit von *Robison*² und seinen Mitarbeitern begründete Theorie erhebliche Vorteile. Nach *Robison* stammt das im Harn erscheinende Phosphat zum allergrößten Teile aus organischer Bindung, aus der es durch die aktive Tätigkeit der Niere abgespalten wird. Auf die physiologische Bedeutung dieser Anschauung ist vor kurzem von *Jost*³ in einer Arbeit aus dem *Embdenschen* Institut über die Rolle der von *Greenwald*⁴ erstmals beschriebenen Diphosphoglycerinsäure der roten Blutkörperchen hingewiesen worden. Stellen wir uns auf den Boden der *Robisonschen* Anschauungen, so ließe sich die Wirkung des Insulins in zweifacher Weise erklären: Einmal könnte durch Insulin die phosphatabspaltende Wirkung der Niere — die Phosphatase — gehemmt werden. Es könnten aber auch die entstehenden Phosphorsäureester — sei es aus struktur-chemischen oder physikalisch-chemischen Ursachen — für die Niere selbst weniger angreifbar werden. Speziell durch die Untersuchungen *Löwis*⁵ und seiner Mitarbeiter, welche das Permeabilitätsprinzip in den Vordergrund der Insulinwirkung gestellt haben, gewinnt auch diese Möglichkeit an Wahrscheinlichkeit.

Wir haben zunächst die Frage experimentell geprüft, ob unter Insulinwirkung die phosphatabspaltende Funktion der Niere gehemmt ist.

Als Versuchstiere dienten weiße Mäuse, die mit 0,3 bis 0,5 Einheiten Insulin *Lilly* subkutan injiziert und nach Eintritt der ersten Anzeichen von Insulinvergiftung verarbeitet wurden. Von Versuchen mit Zusatz von Insulin in vitro haben wir auf Grund von Erfahrungen in zahlreichen anderen Versuchen, über die demnächst berichtet werden

¹ *Cushny*, Die Absonderung des Harns, S. 129, Jena, W. Fischer, 1926.

² *Robison*, Biochem. Journ. 17, 286, 1923; ferner *Eichholtz*, *Brull* und *Robison*, Proc. of the Roy. soc. of London, B., 99, 91, 1925.

³ *Jost*, H.-S. 165, 171 bis 214, 1927.

⁴ *Greenwald*, Journ. of biol. Chem. 63, 339, 1925.

⁵ *Pflügers Arch.* 210, 238, 1925 u. ff.

soll, Abstand genommen. Als organische Phosphorverbindungen wählten wir hexosediphosphorsaures Natrium, das nach Vorschrift von *Neuberg* und *Sabetay*¹ durch Umsetzung des käuflichen Candiolin „Bayer“ mit Natriumoxalat hergestellt wurde. Wir sind uns dabei wohl bewußt, daß in der verwendeten Hexosediphosphorsäure kein eigentlich physiologisches Substrat vorliegt. Die leichte Zugänglichkeit des Ausgangsmaterials und die bequeme Umsetzung legten jedoch ihre Verwendung nahe.

In allen Versuchen wurde gleichzeitig auch die Abspaltung von Phosphat geprüft, welche die Organe normaler, gleichgehaltener Tiere für sich und aus zugesetztem Hexosediphosphat bewirkten. Die Technik war im einzelnen folgende: Die Mäuse wurden durch Dekapitation mit der Schere getötet. Nach möglichst vollkommener Entblutung wurden die Nieren, die in allen Untersuchungen blaß und praktisch blutleer waren, in einem kleinen Achatmörserchen zerschnitten und zu einem homogenen Brei verrieben. Von diesem wurden nach Tunlichkeit gleich große Mengen auf der Torsionswaage genau eingewogen und in den Kontrollversuchen in Reagenzröhrchen eingebracht, welche 5 ccm einer auf p_H 6,8 gepufferten Ringer- bzw. physiologischen Kochsalzlösung enthielten. In den Versuchen mit Hexosediphosphat wurden 4 ccm der gepufferten Salzlösung mit 1 ccm einer annähernd 1%igen Lösung von hexosediphosphorsaurem Natrium versetzt. Die Ansätze wurden in breiten Reagenzgläsern, wie sie zur Reduktionsbestimmung nach *Hagedorn-Jensen* zur Verwendung kommen, gemacht; um eine ständige Durchmischung des Inhalts zu erreichen, wurde während der ganzen Versuchsdauer Luft durchgesaugt, welche erst durch Durchleiten durch Wasser von 37° mit Wasserdampf gesättigt wurde, um einen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Durchlüftungsröhrchen waren an ihrem blinden Ende im rechten Winkel zur Achse des Röhrchens zu einer Spirale gebogen, die mit einer Reihe von kleinen Öffnungen versehen war, so daß die allseits vom Boden des Gefäßes aufsteigenden feinen Luftbläschen eine ständige, gleichmäßige Durchmischung der Organsuspension bewirkten. Die Versuche dauerten eine Stunde bei 37°. Nach dieser Zeit wurde von dem Organbrei durch eine mehrfache Lage Gaze filtriert; vom Filtrat wurden 4 ccm mit 1 ccm 20%iger Trichloressigsäure enteiweißt, das eiweißfreie Filtrat weiter nach *Tisdall* durch Fällung mit Strychninmolybdänsäure-reagens auf Phosphor verarbeitet. Zur Berücksichtigung der minimalen, aus dem Hexosediphosphat abgespaltenen Mengen von anorganischem Phosphor wurde bei jedem Ansatz ein Blindversuch unter den gleichen Mengenverhältnissen und Bedingungen angesetzt, der unter Zusatz

¹ *Neuberg* und *Sabetay*, diese Zeitschr. 161, 240, 1925.

der gleichen Trichloressigsäuremengen verarbeitet wurde. Die ermittelten Phosphormengen, die sich konstant um den Betrag von 0,05 mg P für das zum Versuch verwendete Hexosediphosphat bewegten, wurden vom Resultat in Abzug gebracht. Zu jedem Versuch wurde die Lösung von Hexosediphosphat frisch hergestellt, da wir aus anderweitigen Untersuchungen die Erfahrung gemacht haben, daß die Lösungen auch bei Aufbewahrung unter Toluol im Eisschrank sehr schnell der Zersetzung anheimfallen und ihr Gehalt an anorganischem Phosphat von Tag zu Tag zunimmt.

Neben den Werten für die verwendeten Organmengen wurde des besseren Vergleichs wegen auf 100 g Organ umgerechnet. Die Zahlen für die aus Hexosediphosphat abgespaltene Phosphormenge sind durch Abzug der im Leerversuch ermittelten Phosphatmengen von der Gesamtphosphorsäuremenge im Hauptversuch gewonnen.

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Gewicht der Tiere	Kontrollversuche			Versuche mit Zusatz von Hexosediphosphat				Anmerkung
		Verarbeitete Organmenge	Abgegebener P	Abgegebener P für 100 g Organ	Verarbeitete Organmenge	Gesamt-P	Gesamt-P für 100 g Organ	Aus zugesetztem Hexosediphosphat abgespaltene P-Menge	
		mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	
a) Versuche an Normaltieren.									
1	22	80	0,090	112	81	0,420	518	406	
2	21	81	0,162	200	91	0,547	601	401	
3	21	75	0,153	204	77	0,466	605	401	
4	25	71	0,141	199	103	0,611	594	395	
Mittelwert:				178,75				400,75	
b) Versuche an insulinvergifteten Tieren.									
1 a	23	93	0,112	121	90	0,420	392	271	0,4 E. Insulin, nach 2 Std. Krämpfe, getötet
2 a	25	106	0,200	189	106	0,477	450	261	0,5 E. Insulin, nach 90 Min. Krämpfe, getötet
3 a	22	101	0,155	153	107	0,480	449	296	0,5 E. Insulin, nach 90 Min. im Krampf getötet
3 b	21	106	0,130	122	100	0,285	285	163	0,4 E. Insulin, nach 2 Std. m. Vergiftungserscheinungen getötet
4 a	21	116	0,150	129	117	0,356	304	175	0,4 E. Insulin, nach 2 Std. m. schweren Erscheinungen getötet
4 b	17	107	0,155	145	80	0,354	442	297	0,3 E. Insulin, nach 2 Std. 20 Min. unt. Krämpfen getötet
Mittelwert:				143				243,8	

Wie aus Tabelle I hervorgeht, sind die von der normalen Niere aus Hexosephosphat abgespaltenen Phosphormengen auffallend konstant und bewegen sich um rund 400 mg Phosphor für 100 g Organ. Weniger konstant sind die P-Mengen, die im Leerversuch abgespalten werden. Hier finden wir erhebliche Differenzen, die möglicherweise mit dem funktionellen Zustand der Niere zu erklären sind. Aus diesem Grunde sehen wir auch von einer Verwertung dieser Zahlen im Vergleich zu den bei insulinbehandelten Tieren ab. Der Mittelwert der in den Normalversuchen ermittelten P-Abspaltung durch die Niere allein liegt zwar höher als in den Insulinversuchen, doch möchten wir daraus vorläufig keine weiteren Schlüsse ziehen.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei den mit Insulin behandelten Tieren. Hier zeigt sich durchgehend eine beträchtliche Herabsetzung der Phosphorabspaltung aus Hexosephosphat. Die Werte liegen zwischen 163 und 297 mg für 100 g Organ, im Mittel 244 mg. Es kommt dies einer Herabsetzung auf rund 41 bzw. 74 %, im Mittel auf rund 62 % gegen den Normalwert gleich.

Im Rahmen der von *Robison* aufgestellten Theorie der Phosphatausscheidung durch die Niere würde dieses Resultat besagen, daß durch Insulin die phosphatabspaltende Funktion der Niere — die Nierenphosphatase — beträchtlich gehemmt wird. Dadurch wird das weitere Absinken der Phosphatausscheidung durch den Harn, bei gleichzeitiger Steigerung des anorganischen Phosphats im Blute, zwanglos erklärt. Wir möchten durchaus nicht behaupten, daß in dieser Erscheinung die einzige Ursache für die Abnahme des Harnphosphats unter Insulinwirkung zu erblicken ist. Bei der Kompliziertheit, welche die Insulinwirkung auch in anderer Hinsicht aufweist, sind gewiß noch andere Momente, wie sie eingangs kurz gestreift wurden, in den Bereich der Möglichkeit zu ziehen. Immerhin glauben wir aber, daß unsere Ergebnisse einen Teil der Erscheinungen zu erklären vermögen.

Zusammenfassung.

Die Nieren insulinvergifteter Mäuse zeigen im Vergleich zu den Organen normaler Tiere eine beträchtliche Herabsetzung des Vermögens, Phosphorsäure aus hexosediphosphorsaurem Natrium abzuspalten.

Diese Hemmung der Nierenphosphatase kann vielleicht zur Erklärung des Absinkens der Phosphatausscheidung durch den Harn unter endogener und exogener Insulinwirkung herangezogen werden.

Eine kolorimetrische Mikrobestimmung des Natriums.

Von

H. K. Barrenscheen und Luise Messiner.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 1. August 1927.)

Die heute üblichen Mikromethoden zur Bestimmung des Natriums lassen sich auf zwei Fällungsreaktionen zurückführen:

Die eine Gruppe von Methoden benutzt die auch in der quantitativen Makroanalyse am meisten angewendete Fällung des Natriums als schwerlösliches Pyroantimoniat. In die Biochemie ist die Pyroantimoniatmethode systematisch zuerst von *Kramer* und *Tisdall*¹ als gravimetrische Bestimmung eingeführt worden. Ihre Ausarbeitung für die Mikroanalyse des Blutes und anderer Körperflüssigkeiten hat die Arbeit von *Müller*² gebracht, welche die Wägung des Pyroantimoniats durch eine titrimetrische — jodometrische — Bestimmung ersetzte. Die Methodik von *Bálint*³ unterscheidet sich nur durch die Konzentration des Waschalkohols von der *Müllerschen*, auch die von *Kramer* und *Güttelmann*⁴ angegebene Modifikation der ursprünglich *Kramer-Tisdallschen* Methode geht auf dasselbe Prinzip zurück. Der Fällung als Pyroantimoniat bedient sich auch *Lebermann*⁵, welcher den Natriumgehalt durch den Vergleich mit der in Standardröhrchen von abgestuftem Kochsalzgehalt entstehenden Trübung bestimmt.

Neben der Pyroantimoniatmethode ist auch die Fällung des Natriums als Natrium-Cäsium-Wismutnitrit durch das *Ballsche* Reagens zur quantitativen Bestimmung herangezogen worden. Für Serum wurde die Methode erstmals von *Doisy* und *Bell*⁶ verwendet. In einer sorgfältigen Untersuchung hat dann *Tschopp*⁷ das Verfahren zu einer Mikromethode umgestaltet, die eine kolorimetrische, titrimetrische oder elektrolytische Bestimmung gestattet.

Alle angeführten Verfahren liefern klinisch mehr oder weniger brauchbare Resultate, sie leiden jedoch an einer gewissen Umständlichkeit. Speziell die Fällung als Natrium-Cäsium-Wismutnitrit mit dem *Ballschen* Reagens macht wegen der unbedingt notwendigen Einhaltung niedriger Temperaturen bei der Verarbeitung und wegen der äußerst leichten Zer-

¹ Journ. of biol. Chem. 46, 467 bis 473, 1921.

² Helvet. chim. acta 6, 1152, 1923.

³ Diese Zeitschr. 150, 424, 1924.

⁴ Journ. of biol. Chem. 62, 353, 1924.

⁵ Klin. Wochenschr. 1924, Jg. 3, S. 2196.

⁶ Journ. of biol. Chem. 45, 313, 1921.

⁷ Helvet. chim. acta 8, 893, 1925.

setzlichkeit des Reagens einige Schwierigkeiten. Als daher vor kurzem von *Kolthoff*¹ auf die große Empfindlichkeit der seinerzeit von *Streng*² angegebenen Fällung des Natriums als komplexes Uranyl-Magnesium-Natriumacetat, $3 \text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, bzw. als Uranyl-Zink-Natriumacetat, $(\text{UO}_2)_3\text{ZnNa}(\text{CH}_3\text{COO})_9 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, hingewiesen wurde, haben wir den Versuch unternommen, diese Reaktion zu einer kolorimetrischen Mikromethode für biologische Zwecke auszugestalten.

Für quantitative Zwecke wurde die *Strengs*che Fällung bereits von *Blanchetière*³ zu einer gravimetrischen Bestimmung verwertet. Die Mengen Blut, die er für seine Zwecke verarbeitet (10 ccm), sind jedoch viel zu hoch, als daß die Methode für klinische Zwecke in Frage kommen könnte, abgesehen davon, daß gravimetrische Bestimmungen für Serienuntersuchungen, wie sie die biologische und klinische Fragestellung verlangt, viel zu zeitraubend sind. Die Brauchbarkeit der *Blanchetières*chen Methode wurde von *Barthe* und *Dufilho*⁴ bestätigt, während *Crepaz*⁵ ihre Anwendung wegen zu großer Ungenauigkeit ablehnt⁶.

Für die kolorimetrische Auswertung verwendeten wir die Umsetzung, die Uranylsalze mit Ferrocyankalium geben, entsprechend der Gleichung $\text{K}_4(\text{FeCN})_6 + \text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 = \text{UO}_2\text{K}_2(\text{FeCN})_6 + 2 \text{CH}_3\text{COOK}$. Die bei dieser Reaktion entstehende braunrote Färbung ist bei Einhaltung entsprechender Verdünnungen äußerst stabil und zeigt auch nach stundenlangem Stehen keinerlei Trübung oder Ausflockung. Bei einiger Übung läßt sie sich gut kolorimetrieren, doch ist die Anwendung eines Kolorimeters von einwandfreier Optik, z. B. das neue *Leitz*-Kolorimeter, Voraussetzung für erfolgreiches Arbeiten.

Zur Bestimmung sind folgende Reagenzien notwendig:

1. Fällungsreagens. Das Reagens wird nach *Kolthoff* folgendermaßen hergestellt:

Lösung a: 10 g Uranylacetat,
6 g 30%ige Essigsäure werden in Wasser zu
50 g unter leichtem Erwärmen gelöst.

Lösung b: 30 g Zinkacetat,
3 g 30%ige Essigsäure werden auf
50 g in Wasser unter Erwärmen gelöst.

¹ Zeitschr. f. analyt. Chem. 70, 397, 1927.

² Ebendasselbst 25, 237, 1886.

³ Bull. de la soc. chim. de France (4) 38, 807, 1923.

⁴ C. r. de la soc. de l'acad. de scienc. 182, 1470 bis 1473, 1926.

⁵ Annali chim. appl. 16, 219, 1926.

⁶ In neuester Zeit ist von *André Nau* (Ref. Chem. Centralbl. 1927, II, S. 467) die *Blanchetières*che gravimetrische Bestimmung zu einer volumetrischen umgestaltet worden. Das gefällte Uranyl wird durch Reduktion mit Zn und H_2SO_4 in Uranosalz übergeführt und dieses mit KMnO_4 zurücktitriert. Dadurch werden wesentlich geringere Na-Mengen bestimmbar als bei der gravimetrischen Methodik.

Die Lösungen werden warm gemischt, die Mischung bleibt am besten über Nacht stehen, vom eventuell gebildeten Natriumniederschlag wird filtriert. Bei Aufbewahrung in natronfreien Gläsern ist das Reagens ohne weitere Vorsichtsmaßregeln haltbar.

2. 96 %iger Alkohol.

3. 50 %iger Alkohol (als Waschflüssigkeit).

4. Verdünnte (10 %ige) Essigsäure.

5. 20 %ige Lösung von Ferrocyankalium.

6. Gesättigte alkoholische Zinkacetatlösung (zur Enteiweißung und Entfernung anorganischen Phosphats).

7. Standardnatriumlösung. Die Lösung enthält 254,17 mg reinstes Kochsalz im Liter. 1 ccm entspricht 0,1 mg Na. Zur Vermeidung von Bakterien- und Pilzwachstum setzt man der Lösung vorteilhaft einige Kubikzentimeter Chloroform zu.

Nach *Kolthoff* ist die Empfindlichkeit der Reaktion am größten in alkoholischer Lösung, und zwar empfiehlt er eine ungefähr 33 %ige Konzentration von Alkohol. Nach zahlreichen Versuchen hat sich uns die Durchführung der Fällung in einem ungefähr 50 %igen Alkohol am besten bewährt. Niedrigere Alkoholkonzentrationen führen wegen der Löslichkeit der komplexen Natriumverbindung zu Verlusten, wesentlich höhere Konzentrationen bewirken ein Ausfallen von Zinkacetat, das bei der späteren Umsetzung mit Ferrocyanid stört.

In einer Reihe von Vorversuchen wurde festgestellt, daß die entstehenden Färbungen sich der Konzentration des Uranylsalzes proportional verhalten und daß das *Beersche* Gesetz innerhalb beträchtlicher Konzentrationsänderungen seine Geltung hat (siehe auch Tabelle I). Wir haben dann die Brauchbarkeit der Methode an einer Reihe von reinen Kochsalzlösungen, die durch genaue Einwäge von reinstem NaCl auf der Mikrowage und Auflösen in 100 ccm Meßkolben hergestellt wurden, kontrolliert. Die entsprechenden Daten sind aus Tabelle I ersichtlich.

Im einzelnen gestaltet sich die Bestimmung an reinen Salzlösungen folgendermaßen:

1 ccm der zu untersuchenden Lösung wird mit geeichter Vollpipette in graduierte Zentrifugenröhrchen¹ aus Jenaer Hartglas abgemessen, mit 3 ccm 96 %igem Alkohol und 2 ccm Fällungsreagens versetzt und gründlich gemischt. Von der Standardlösung werden

¹ Die Form der Zentrifugengläschen wurde ähnlich der von *de Waard* für die Kalkbestimmung angegebenen gewählt. Die Gläschen sind bis 0,1 in hundertstel Kubikzentimeter graduiert, um eine Schätzung der Niederschlagshöhe zu ermöglichen.

1 ccm = 0,1 mg Na in der gleichen Weise behandelt. Nach halbstündigem Stehen wird 5 Minuten zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit möglichst vollständig abgegossen; eventuell am Rande des Gläschens haftende Tropfen werden mit einem reinen Tuche abgewischt. Unter allseitiger Abspülung der Wand des Zentrifugengläschens wird dreimal mit je 3 ccm 50 %igem Alkohol durch 3 Minuten langes Zentrifugieren nachgewaschen. Der letzte Spülalkohol wird möglichst vollständig abgegossen, der kristallinische, hellgelb gefärbte Niederschlag durch Zusatz von 0,5 ccm verdünnter Essigsäure und einigen Kubikzentimetern Wasser in Lösung gebracht, die Lösung quantitativ unter wiederholtem Nachspülen in Meßkölbchen übergeführt. Die Standardlösung wird auf 50 ccm aufgefüllt, für die Wahl der Verdünnung der zu untersuchenden Lösung ist der Vergleich zwischen der Höhe des Niederschlags im Standardröhrchen und der zu untersuchenden Lösung maßgebend. Bei Niederschlagsmengen, welche über das doppelte Volumen des Standardniederschlags betragen, verdünnt man zweckmäßig auf 100 ccm, bei Mengen unter der Hälfte des Standardniederschlags auf 20 bzw. 25 ccm. Nach Auffüllung bis zur Marke werden bei einem Volumen von 50 ccm 0,5 ccm der 20 %igen Ferrocyanolösung zugesetzt, bei Wahl einer anderen Verdünnung ist die Menge Ferrocyanolösung entsprechend zu ändern. Nach gründlichem Mischen läßt man 2 bis 3 Minuten stehen und kolorimetriert bei einer Standardeinstellung auf 15 mm. Die Berechnung der Milligrammprocente ergibt

Tabelle I.

Bestimmungen an reinen Kochsalzlösungen.

NaCl-Einwage für 100 ccm mg	Zur Bestimmung verwendete ccm	Na gef. mg	Na ber. mg	Differenz	
				absolut	%
25,417	0,5	0,05	0,05	0	0
	1,5	0,1482	0,150	— 0,001 8	— 1,2
	2	0,199	0,200	— 0,001	— 0,5
	2	0,2	0,200	0	0
50,834	0,5	0,1007	0,100	+ 0,000 7	+ 0,7
	0,75	0,1494	0,150	— 0,000 6	— 0,4
20,976	1,0	0,0812	0,082 5	— 0,001 3	— 1,25
	2	0,163	0,165	— 0,002	— 1,21
	2	0,1667	0,165	+ 0,001 7	+ 1,03
15,270	1,0	0,0595	0,060 08	— 0,000 58	— 0,96
	1	0,0597	0,060 08	— 0,000 38	— 0,63
	1	0,0607	0,060 08	+ 0,000 62	+ 1,03
	2	0,120	0,120 2	— 0,000 2	— 0,16
16,662	1	0,0705	0,071 6	— 0,001 1	— 1,54
11,822	1	0,0469	0,046 51	+ 0,000 39	+ 0,84
	1	0,0471	0,046 51	+ 0,000 6	+ 1,27
25,148	1	0,0989	0,098 9	0	0
30,182	1	0,1176	0,118 7	— 0,001 1	— 0,97

sich bei Auffüllung auf 50 ccm aus folgender Formel: $\text{mg}\cdot\% = 15/a \cdot 10$, wo a die abgelesene Höhe der unbekannten Lösung bedeutet. Die Brauchbarkeit der Methode bei reinen Kochsalzlösungen ergibt sich aus der Tabelle I.

Für die Anwendung auf biologisches Material scheint zunächst die Methode den Nachteil zu haben, daß außer Eiweiß auch das anorganische Phosphat vorher zu entfernen ist. Alle übrigen sonst in biologischen Flüssigkeiten vorkommenden Kationen, besonders Kalium, Calcium, Magnesium, Ammonium stören in den in Betracht kommenden Konzentrationen in keiner Weise. Die Entfernung des Phosphats gelingt nun einwandfrei und ohne Aufwand von Zeit und Mühe durch eine gesättigte alkoholische Zinkacetatlösung, welche gleichzeitig auch eine vollständige Enteiweißung bedingt.

Wir haben eine Reihe von Kontrollbestimmungen ausgeführt, in denen primäres und sekundäres Kaliumphosphat in Mengen, wie sie im Blut bzw. im Harn zu erwarten sind, zu reinen Kochsalzlösungen zugesetzt wurde. Nach der Behandlung mit Zinkacetat war qualitativ mit dem äußerst empfindlichen Strychninmolybdatreagens Phosphat niemals nachweisbar. Die mit den Filtraten ausgeführten kolorimetrischen Bestimmungen ergaben keinen Verlust an Natrium. Die gegen den theoretischen Wert erhaltenen Differenzen schwankten innerhalb der bei reinen Kochsalzlösungen erhaltenen und betrugen maximal $\pm 1,5\%$.

Für die Bestimmung im Serum bzw. Harn gestaltet sich die Methode folgendermaßen: 0,1 ccm Serum wird mit geeichter Pipette in ein graduiertes Zentrifugenröhrchen, das mit 0,9 ccm Wasser beschickt ist, ausgeblasen, die Pipette durch mehrmaliges Aufziehen und Wiederausblasen nachgespült. Nach Zusatz von 3 ccm gesättigter alkoholischer Zinkacetatlösung wird gründlich gemischt und zur besseren Abscheidung des Zinkphosphats für 1 bis 2 Minuten in ein Becherglas mit heißem Wasser gestellt. Nach dem Abkühlen wird ein eventuell durch Kontraktion oder Verdampfen entstandener Verlust mit 96%igem Alkohol aufgefüllt und durch ein trockenes Filter filtriert. Vom Filtrat werden 2 ccm = 0,05 ccm Serum mit 2 ccm Fällungsreagens und so viel 96%igem Alkohol versetzt, daß die schließliche Alkoholkonzentration 50% beträgt. Im übrigen wird wie bei reinen Kochsalzlösungen verfahren. Bei dem hohen Natriumgehalt des Serums empfiehlt es sich, die Untersuchungslösung auf 100 ccm aufzufüllen. Die Berechnung auf Milligrammprocente ist hier $15/a \cdot 200$, wenn auf 50 ccm, $15/a \cdot 400$, wenn auf 100 ccm aufgefüllt wurde. Wir geben in nachstehender Tabelle II einige an Serum gewonnene Resultate und gleichzeitig Beispiele von Wiederfinden zugesetzten Kochsalzes. Für Harn wird

1 ccm einer zehnfachen Verdünnung mit 3 ccm Zinkacetat behandelt und von dem Filtrat 2 ccm = 0,05 ccm Harn verarbeitet. Auch hier liefert die Methode einwandfreie Werte.

Tabelle II.

Natriumbestimmung im Serum; verwendete Serummengung 0,1 ccm.

Nr.	Natrium mg.°/o	Zugesetztes Na mg	Wiedergefund. Na mg.°/o	Differenz
1	324,4	—	—	—
2	328	—	—	—
3	287	—	—	—
4	357,4	—	—	—
	456,6	100	99,2	— 0,8
	455,2	100	97,8	— 2,2
5	352,8	—	—	—
	403,7	50	50,9	+ 0,9

Biochemische Beobachtungen über das Wachstum der Typhusbazillen.

Von

Ant. Doskočil.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie in Prag.)

(Eingegangen am 5. August 1927.)

Der Zweck dieser Arbeit ist, zu erforschen, inwieweit die Typhusbazillen stickstoffhaltige Verbindungen zu spalten und synthetisch zu bilden vermögen. Wie man aus weiterem ersieht, wurden vorläufig nur die groben Umsetzungen untersucht, die Beobachtung der feineren Veränderungen wird erst nach und nach vorgenommen, wie es die Schwierigkeit des Problems mit sich bringt.

Als einfachster Nährboden, auf dem in jedem Falle eine üppige Wucherung der Typhusbazillen zu erzielen war, erwies sich das milchsaure Ammonium. Der Nährboden enthielt 2 g Kochsalz, 2,5 g Dinatriumphosphat, 5 g Milchsäure, 2,5 g Ammoniumcarbonat, 0,20 g Calciumchlorid und 0,20 g Magnesiumsulfat in einem Liter destillierten Wassers. Es war notwendig, die saure Reaktion der Lösung vor der Infektion mit einer normalen Sodalösung abzustumpfen. Die Reaktion war dann ausgedrückt durch ein $p_H = 7,4$. Ein Liter dieser Lösung wurde dann mit einer Platinöse der Typhusbazillen infiziert. Die Mikroben vermehrten sich in dieser Lösung im Laufe von drei Tagen so weit, daß ein Tropfen derselben unzählige Bazillen enthielt, wie durch die Aussaat auf Platten festgestellt wurde.

Die infizierte Lösung war auch bald im Vergleich mit der sterilen Kontrollprobe stark rauchartig getrübt. Während der ganzen Beobachtungszeit von anderthalb Monaten kam es zu keiner merklichen Abnahme der Zahl der Mikroben in der infizierten Lösung. Die Änderung der Reaktion und die Abnahme der Milchsäuremenge in der infizierten Probe sind durch folgende Ziffern charakterisiert.

Tabelle I.

Datum	Reaktion P_H	Milchsäuremenge %
5. XII. 1926	— 7,2	0,52
20. XII. 1926	— 7,6	0,30
29. XII. 1926	— 8,0	0,20
22. I. 1927	— 8,4	0,01

Die auf dieselbe Art hergestellte sterile Kontrolllösung zeigte weder eine Änderung der Reaktion noch eine Abnahme der Milchsäuremenge. Letztere wurde hier wie bei der infizierten Lösung mittels des bekannten Aldehydverfahrens bestimmt.

Das Ergebnis dieses Versuchs weist darauf hin, daß zur Entwicklung einer starken Kultur von Typhusbazillen das Ammoniak allein als Stickstoffquelle genügt, wenn es an eine geeignete Säure, die als Kohlehydratquelle dienen kann, gebunden ist.

Auf einer Lösung, welche Alanin in einer Menge von 0,50 % enthielt, gediehen die Typhusbazillen auch üppig. Bei dieser Probe wurde außer der Reaktion auch die Menge des freigebundenen Ammoniaks nach *Folin* bestimmt. Die gefundenen Zahlen sind aus der Tabelle II zu erlesen.

Tabelle II.

Datum	Sterile Kontrolllösung		Infizierte Lösung	
	Reaktion P_H	Ammoniak- menge	Reaktion P_H	Ammoniak- menge g
19. IX.	6,8	—	6,8	—
6. X.	6,8	—	7,3	—
15. X.	6,8	Spuren	8,2	0,065

Die Ammoniakmenge ist auf 100 ccm der ursprünglichen Lösung berechnet.

Man sieht, daß in diesem Versuch eine starke Alkalisierung der infizierten Lösung erfolgte und auch eine Zunahme des freigebundenen Ammoniaks stattgefunden hat. Die Menge des freigemachten Ammoniaks war in Wirklichkeit sicher viel größer, da die ziemlich stark alkalische Reaktion der infizierten Lösung die Möglichkeit der Entweichung des Ammoniakgases begünstigte.

Asparaginsäure in einer Menge von 0,25 %, und die Glutaminsäure in einer Menge von 0,50 % der Salzlösung zugesetzt, erwiesen sich auch als vortreffliche Nährstoffe für den Typhusbazillus. Bei diesen

Verbindungen wurde außer der Bestimmung der aktuellen Reaktion und des freigebundenen Ammoniaks auch die Titration nach *Sørensen* durchgeführt. Wir kamen dabei auf folgende Zahlen.

Tabelle III.
Die Kontrollproben.

Die Aminosäure	Datum	Reaktion	Ammoniak- menge	Zahl der ccm n/10 NaOH *
Asparaginsäure . .	25. IX.	7,5 ccm n/10 NaOH	—	—
" . .	8. X.	7,3 " n/10 "	Spuren	20
Glutaminsäure . .	25. IX.	9 " n/10 "	—	—
" . .	14. X.	8,8 " n/10 "	Spuren	40

* Bedeutet die Zahl der bei der Titration nach *Sørensen* verbrauchten ccm n/10 NaOH.

Tabelle IV.
Die infizierten Proben.

Die Aminosäure	Datum	Reaktion	Ammoniak- menge g	Zahl der ccm n/10 NaOH
Asparaginsäure . .	25. IX.	7,5 ccm n/10 NaOH	—	—
" . .	8. X.	10 " n/10 H ₂ SO ₄	0,017	13
Glutaminsäure . .	25. IX.	9 " n/10 NaOH	—	—
" . .	14. X.	5 " n/10 H ₂ SO ₄	0,022	23

Alle die angeführten Zahlen sind wieder auf 100 ccm der untersuchten Lösung berechnet.

Aus allen diesen Beobachtungen kann man den Schluß ziehen, daß die Typhusbazillen aus den drei genannten Aminosäuren Ammoniak abspalten und auch die Gruppe COOH angreifen, wodurch ein Ansteigen der alkalischen Reaktion und eine Vermehrung des freigebundenen Ammoniaks zustande kommt. Wenn den geprüften Aminosäuren noch Glucose zugesetzt wurde, so kam es zu einer Säuerung der betreffenden Lösung.

Tabelle V.

Die Aminosäure	Datum	Reaktion p _H	Glucosemenge ‰
Alanin	19. VII.	6,8	0,42
"	27. VII.	6,2	—
"	4. VIII.	6,0	0,38
Asparaginsäure	19. VII.	6,2	0,45
"	27. VII.	5,8	—
"	4. VIII.	5,6	0,37

Glykokoll, Tyrosin und Lysin konnten den Typhusbazillen nur dann als Stickstoffquelle dienen, wenn der Lösung gleichzeitig Glucose

oder Milchsäure zugesetzt wurde, was darauf hinweist, daß die genannten Stoffe als Kohlehydratquelle für die Typhusbazillen nicht geeignet sind. Auch hier trat jedoch eine Zunahme des freigegebenen Ammoniaks ein, was auf eine Desamidierung der angewendeten Aminosäuren schließen läßt.

Auf einer Lösung von Kreatin und Kreatinin oder von harnsaurem Kalium oder von Hippursäure erfolgte ein Wachstum von Typhusbazillen auch dann nicht, wenn Glucose dem Nährboden zugesetzt wurde. Der Stickstoff dieser Verbindungen scheint demnach den Typhusbazillen nicht zugänglich zu sein.

Auf einer Lösung, die Harnstoff enthielt, gediehen die Bazillen nur dann, wenn dem Nährboden zugleich Glucose beigelegt wurde. Die quantitative Bestimmung des Harnstoffs mit Xanthydrol zeigte jedoch keine Abnahme des Harnstoffs in der infizierten Probe im Vergleich zu der Kontrollprobe. Wir erklären diese Tatsache so, daß in diesem Versuch als Stickstoffquelle für die Mikroben Ammoniak zu betrachten ist, der von dem Harnstoff bei seiner teilweisen Zersetzung durch Sterilisation abgespalten und an das in der Lösung anwesende saure Kaliumphosphat gebunden wurde.

Das phosphorsaure Ammonium erwies sich nämlich als guter stickstoffhaltiger Nährstoff für die Typhusbazillen, wenn der Lösung Glucose zugesetzt war. Auch hier erfolgte bei dem Wachstum der Bazillen eine Säuerung des Nährbodens. Zwei andere anorganische Ammoniumsalze, das ist chlorsaures und schwefelsaures Ammonium, genügten nicht zur Erhaltung des Lebens und des Wachstums der Typhusbazillen, auch nicht bei Zugabe von Glucose. Welches der Grund dieser Erscheinung war, kann man vorläufig nicht beurteilen.

Auf den Salzen der Glykokollsäure gediehen die Typhusbazillen in unseren Versuchen nicht gerade üppig, sehr gut dagegen auf den Salzen der Taurocholsäure. Die Acidität der Lösung stieg dabei etwas an, von $p_H = 7,8$ auf $p_H = 7,4$ im Laufe von 20 Tagen.

Von den kompliziert gebauten stickstoffhaltigen Verbindungen wurden die Eiweißstoffe des menschlichen Serums und der Milch, dann die Albumosen des Peptons *Witte* zur Züchtung der Typhusbazillen verwendet. Die genannten Verbindungen wurden durch das Auswaschen durch geeignete Salze mit Ausnahme des Ammoniumsulfates gewonnen, durch Dialyse gereinigt und in destilliertem Wasser aufgelöst. Die Sterilisierung der Lösungen erfolgte durch wiederholtes Erwärmen auf 58°C . Die Typhusbazillen gediehen in allen diesen Lösungen gut, wenn nur die Dialyse nicht allzulange fortgesetzt wurde, oder wenn die Verbindungen nicht durch wiederholte Fällung mit Alkohol und

Auflösen in Wasser gereinigt wurden. Letztere Prozedur konnte natürlich nur bei Serumalbumin und bei Albumosen angewendet werden. In denjenigen Proben, wo Wachstum der Bazillen erfolgte, wurden nach Beendigung des Versuchs die Eiweißstoffe durch Hitze gefällt, abfiltriert und ihre Menge mittels der Stickstoffbestimmung festgestellt. In den Filtraten von koaguliertem Eiweiß wurde die Stickstoffmenge nicht bestimmt, da durch Hitze die flüchtigen Stickstoffverbindungen entfernt werden konnten, und somit brauchbare Resultate kaum zu erreichen waren. Ein Unterschied in der Stickstoffmenge der Filtrerrückstände der Kontrollproben und der infizierten Proben wurde nicht festgestellt. Dieselbe Beobachtung wurde auch mit den Albumosen gemacht. Die Fällung der Albumosen erfolgte hier mit Natriumsulfat bei saurer Reaktion.

Das Ganze weist darauf hin, daß eine Proteolyse, wie wir sie unter dem Einfluß des Pepsins oder Trypsins beobachten, durch Typhusbazillen, wenigstens bei Eiweißstoffen des menschlichen Serums, nicht in merkbarer Menge bewerkstelligt wird. Das Wachstum der Mikroben erfolgte in unseren Versuchen höchstwahrscheinlich auf Kosten der einfacheren Stickstoffverbindungen, die aus dem Blutserum mit dem gefällten Eiweiß mitgerissen wurden. Dieselben Erwägungen gelten natürlich auch bei Albumosen. Als Beweis dafür kann erstens die Tatsache dienen, daß kein Wachstum der Bazillen auf den oben genannten Eiweißstoffen erfolgte, wenn die Dialyse längere Zeit fortgesetzt wurde, wobei die einfacheren Stickstoffverbindungen höchstwahrscheinlich weggespült wurden, und zweitens die Tatsache, daß es möglich war, die Bazillen auf einem Filtrat von geronnenem Eiweiß zu züchten. Die Reaktion der infizierten Lösungen wurde da gegenüber den Kontrollproben wieder alkalischer.

In der Milch geschieht das Wachstum der Typhusbazillen ebenfalls auf Kosten des sogenannten Reststickstoffs, wie aus den angeführten Zahlen ersichtlich ist, welche keine Abnahme des Milcheiweißes zeigen.

Tabelle VI.

	Caseinmenge %	Lactalbumin- und globulinmenge %
Kontrolllösung . . .	3,12	0,35
Infizierte Lösung . .	3,15	0,33

Auf einer Lösung des Caseins wuchsen die Typhusbazillen nur dann, wenn es vorher der Trypsinverdauung unterzogen wurde. Auf einem durch Säurehydrolyse des Caseins gewonnenen Aminosäuren-

gemeinge wuchsen die Typhusbazillen sehr gut. Auch hier kam es zu einer Erhöhung der alkalischen Reaktion und zu einer Zunahme des freigegebenen Ammoniaks.

Was den Abbau der Kohlehydrate durch die Typhusbazillen anbelangt, so erfolgt der Zerfall der Glucose bekanntlich zuerst über die Milchsäure, was eine Zunahme der Acidität des Glucose enthaltenden Nährbodens erklärt. In unseren Versuchen, wo die Wucherung der Bazillen auf den Lösungen von Aminosäuren ohne Zugabe eines Kohlehydrates erfolgte, wurde bei Anwendung von Alanin und Asparaginsäure qualitativ ebenfalls Milchsäure gefunden. Ihre Menge war bei der von uns gebrauchten Konzentration der Lösungen so klein, daß eine quantitative Bestimmung nicht möglich war. Die Milchsäure scheint danach bei dem Kohlenstoffwechsel der Typhusbazillen eine bedeutende Rolle zu spielen. Welche die weiteren Abbauprodukte dieser Verbindung sind, ist nicht mit Sicherheit zu sagen. In unseren Versuchen konnten wir in den infizierten Lösungen weder Acetaldehyd, noch Formaldehyd, noch Essigsäure nachweisen. Die Bestimmung wurde immer im Destillat der Lösungen vorgenommen. Natürlich soll damit nicht gesagt werden, daß die genannten Stoffe beim Abbau der Milchsäure durch die Typhusbazillen nicht auftreten können, ihre Menge wird aber jedenfalls nicht allzu groß sein, wenn sie mit den üblichen Methoden nicht nachweisbar sind. Bemerkenswert erscheint mir jedoch, daß in den infizierten Lösungen, welche Milchsäure oder Alanin enthielten, die Reaktion von *Adamkiewicz-Hammarsten* positiv war, was auf die Anwesenheit von Glyoxylsäure hinweisen könnte. Der Zerfall der Milchsäure wäre dann in unserem Falle auf folgende Art zu erklären: Aus der Milchsäure entsteht durch Dehydrierung die Brenztraubensäure $\text{CH}_2=\text{C}-\text{COOH}$, aus welcher dann durch Spaltung der

O H

Doppelbindung die Glyoxylsäure $\text{CHO}-\text{COOH}$ entstehen kann. Was weiter mit derselben und mit dem Rest $\text{CH}_2=$ geschieht, kann man nicht sagen, will man sich nicht in mehr oder weniger plausible Hypothesen einlassen. Wie dem auch sei, so viel ist sicher, daß die Typhusbazillen die Milchsäure decarboxylieren, wie das Sinken der Acidität der infizierten Lösung beweist. Es ist nur eine Frage, ob die Kohlen säureabspaltung schon auf der Milchsäure selbst oder auf einer anderen aus ihr entstehenden Säure erfolgt. Zweitens kann man als festgestellt betrachten, daß die Spaltung unter Abspaltung des Wasserstoffs und Aufnahme des Sauerstoffs geschieht, denn Methylenblau, zur infizierten Milchsäurelösung zugefügt, wird entfärbt, Hämatin zum Hämochromogen reduziert.

Im ganzen kann man also vermuten, daß der Abbau der Kohlehydrate durch die Typhusbazillen auf ähnliche Art erfolgt, wie es bei

den anders bedingten Gärungen von *Neuberg* und seiner Schule erforscht wurde.

Am Ende wage ich aus den in dieser Abhandlung beschriebenen Beobachtungen folgende Schlüsse zu ziehen:

1. Als Stickstoffquelle dient den Typhusbazillen das Ammoniak der Ammoniumsalze und der Aminogruppe der Aminosäuren. Der Amidostickstoff und der Imidostickstoff scheint ihnen nicht allgemein zugänglich zu sein. Nur in einem Falle erfolgte das Wachstum der Bazillen auf einer Verbindung, die die Imidogruppe enthält, und zwar auf den Gallensäuren.

2. Als Kohlehydratquelle eignete sich für die Typhusbazillen außer der Glucose und Milchsäure noch die Kohlenstoffkette des Alanins, der Asparagin- und Glutaminsäure, dagegen nicht die Kohlenstoffkette des Tyrosins, Lysins und Glykokolls. Bei dem Alanin und der Asparaginsäure ging der Abbau der Kohlenstoffkette über die Milchsäure und dann weiter vielleicht auch über die Brenztraubensäure und die Glyoxylsäure.

3. In der Pathologie des menschlichen Abdominaltyphus könnte man aus den gemachten Beobachtungen die Tatsache erklären, daß die Typhusbazillen im Dünndarm, in dem Blute und in der Gallenblase in der größten Menge zu finden sind, da sie auf diesen Stellen die für sich geeigneten Nährstoffe angehäuft vorfinden. Die eigentlichen pathologischen Erscheinungen des Bauchtyphus kann man aus unseren bisherigen Versuchen natürlich nicht erklären. Die weitere genaue Prüfung der Biochemie der Typhusbazillen wird uns vielleicht später auch hier wertvolle Schlüsse bringen.

4. In der Epidemiologie des Bauchtyphus könnte man durch die erwähnten Beobachtungen erklären, daß die Typhusepidemien in unseren Gegenden am meisten im Spätsommer nach großen Regen auftreten. Zu dieser Zeit sind große Flächen der Erde mit Vegetation bedeckt, die teilweise einer nicht zum Ende geführten Fäulnis anheimfällt. Dadurch kann es zur Entstehung der leicht löslichen Ammoniumsalze der organischen Säuren kommen, welche in den Gewässern die Wucherung der Typhusbazillen unterstützen können, wenn außerdem die geeignete Temperatur günstig wirkt. In reinem Wasser, wenn auch die äußeren Bedingungen günstig sind, gehen die Typhusbazillen an Nährstoffmangel rasch zugrunde. Ihre Vermehrung kann dann überhaupt nicht erfolgen. Die anders lautenden Resultate von Laboratoriumsversuchen sind nach unseren Beobachtungen dadurch bedingt, daß das Wasser mit allzu großer Menge der Mikroben infiziert wurde. Die zerfallenen Mikroben dienen dann den übrigen als Nahrung, was ein langes Leben der Typhusbazillen ohne geeignete organische Nährstoffe vortäuschen kann.

Literatur.

Kolle-Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorgan. 2 u. 3. — *Krause-Uhlenhuth*, Handb. d. Mikrobiol. Techn. — *Hoppe-Seyler* und *Thierfelder*, Physiol. u. pathol.-chem. Analyse. — *Abderhalden*, Handb. d. biolog. Arbeitsmethod. — *Derselbe*, Lehrb. d. physiol. Chem. — *Lichtwitz*, Klin. Chem. — *Guggenheim*, Die biogenen Amine. — *Neuberg-Nord*, Anwendung der Abfangmethode auf die Bakteriengärungen, diese Zeitschr. 96, 133, 1919. — *Cahn-Bronner*, Über die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen, Centralbl. f. Bakt. 86. — *Kisch*, Die Verwendbarkeit verschiedener chemischer Verbindungen als Stickstoffmaterial pathog. Bakt., ebendasselbst 82. — *Fischer*, Vorlesungen über Bakterien. — *Widal*, Nouveau Traité de Médecine, T. III. — *Arthus*, Précis de la Physiologie microbienne. — *Oppenheimer*, Lehrb. d. Fermente.

Insulin und Fettstoffwechsel.

Ein Beitrag zur Theorie der Insulinwirkung.

Von

Josef Hepner und Oktavian Wagner.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie und aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der böhmischen Universität Prag.)

(Eingegangen am 5. August 1927.)

Trotz unzähliger Bemühungen, den Mechanismus der Insulinwirkung aufzuklären, konnte diese Frage bis jetzt nicht endgültig gelöst werden. Es gibt verschiedene Erklärungen der in den Literaturangaben so häufig vorkommenden Widersprüche in den Resultaten der Versuche. Ein sehr wichtiges Moment ist jedenfalls in der Verschiedenheit der Insulinpräparate zu suchen. Es genügt auch nur auf die „interindividuellen“ und „intraindividuellen“ Unterschiede der Versuchstiere hinzuweisen, welche schon bei der Standardisierung der einzelnen Präparate eine bedeutende Rolle zu spielen scheinen.

Auch in der wichtigen Frage, wohin der Zucker nach der Insulininjektion verschwindet, ist jedenfalls das letzte Wort nicht gefallen. Es sind verschiedene Ansichten ausgesprochen worden (*Dickson* (1), *Laufberger* (2) u. a.). *Laufberger* macht auf drei Möglichkeiten aufmerksam: „Der Zucker wird unter direktem Einfluß des Insulins verbrannt, oder er verwandelt sich in ein Kohlehydrat mit anderen chemischen Eigenschaften bzw. in ein Nichtkohlehydrat um, endlich könnte er auch in anderen Organen aufgestapelt werden.“ In ähnlicher Weise hat sich auch *Dickson* ausgesprochen.

In der vorliegenden Mitteilung hat uns in erster Reihe die zweite von *Laufberger* erwähnte Möglichkeit interessiert, und zwar die Umwandlung der Kohlehydrate in Nichtkohlehydrate unter dem Einfluß des Insulins.

Es wurde in dieser Hinsicht an verschiedene Stoffe gedacht. *Needham* (3) (l. c.) supponierte z. B. die Bildung einer Zyklase, des Inosits, aus der Glucose. Tatsächlich wurde nach Insulindarreichung eine Vermehrung des Inosits um bis 50% festgestellt, jedoch ist die dazu notwendige Menge

der ersten Zeit nach Pankreas-
 über von der Fettinfiltration
 beobachtete *Allan* (17) (l. c.)
 eine neue Fettanlagerung in der
 Änderungen der im Zentrum
 einer beträchtlichen Fett-
 stanz) kommen kann. Das
 man nach *Allan* durch
 tren.

Einmalen Individuum durch
Gay und *Marrian* (18) bei
 wirkte, in der Mitte nur
 Zu ähnlichen Resultaten
 gegen vor dem Ausbruch

Sicheres darüber, wie
 et wird. Es wurden
 das Glykogen beim
 Fett, verwandelt wird.
 Wirkung des Insulins
 bisherigen Versuche
 des Fettstoffwechsels

delezebrierten und
 mit Glykoselösung
 trotzdem die er-
 gewandten Menge
 konnten dieselben
 Fettgehalts nach

Insulindarreicherung
 nachgewiesen.

Pick, *Lombroso*,
 der Fettstoff-
 gar nicht be-
 inkreatisierten
 ung des Fett-
 entschlossen,

zahl gewählt,
 der Leber ist
 erkennen
 oder lang-
 suchen (20)
 eden lange
 dem unten
 ist, weist
 Anstieg

Insulin und Fettstoffwechsel.

Ein Beitrag zur Theorie der Insulinwirkung.

Von

Josef Hepner und Oktavian Wagner.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie und aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der böhmischen Universität Prag.)

(Eingegangen am 5. August 1927.)

Trotz unzähliger Bemühungen, den Mechanismus der Insulinwirkung aufzuklären, konnte diese Frage bis jetzt nicht endgültig gelöst werden. Es gibt verschiedene Erklärungen der in den Literaturangaben so häufig vorkommenden Widersprüche in den Resultaten der Versuche. Ein sehr wichtiges Moment ist jedenfalls in der Verschiedenheit der Insulinpräparate zu suchen. Es genügt auch nur auf die „interindividuellen“ und „intraindividuellen“ Unterschiede der Versuchstiere hinzuweisen, welche schon bei der Standardisierung der einzelnen Präparate eine bedeutende Rolle zu spielen scheinen.

Auch in der wichtigen Frage, wohin der Zucker nach der Insulininjektion verschwindet, ist jedenfalls das letzte Wort nicht gefallen. Es sind verschiedene Ansichten ausgesprochen worden (*Dickson* (1), *Laufberger* (2) u. a.). *Laufberger* macht auf drei Möglichkeiten aufmerksam: „Der Zucker wird unter direktem Einfluß des Insulins verbrannt, oder er verwandelt sich in ein Kohlehydrat mit anderen chemischen Eigenschaften bzw. in ein Nichtkohlehydrat um, endlich könnte er auch in anderen Organen aufgestapelt werden.“ In ähnlicher Weise hat sich auch *Dickson* ausgesprochen.

In der vorliegenden Mitteilung hat uns in erster Reihe die zweite von *Laufberger* erwähnte Möglichkeit interessiert, und zwar die Umwandlung der Kohlehydrate in Nichtkohlehydrate unter dem Einfluß des Insulins.

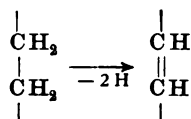
Es wurde in dieser Hinsicht an verschiedene Stoffe gedacht. *Needham* (3) (l. c.) supponierte z. B. die Bildung einer Zyklose, des Inosits, aus der Glucose. Tatsächlich wurde nach Insulindarreichung eine Vermehrung des Inosits um bis 50 % festgestellt, jedoch ist die dazu notwendige Menge

Glucose noch zu klein, um die ganze verschwundene Menge Glucose zu erklären.

Es wurde auch an das Fett gedacht. Nun steht aber die Auffassung einer Umsetzung von Kohlehydraten in Fett in einem gewissen Widerspruch mit anderen, auf diesem Gebiet gemachten Erfahrungen, welche das Verhalten des Fettes in der Leber beim normalen und depankreatisierten Tiere betreffen.

Der Abbau des Fettes in der Leber läßt sich durch zwei Hypothesen ausdrücken: Die *Knoopsche* β -Oxydation (4) und die Desaturationshypothese von *Leathes*.

Leathes und *Meyer-Wedell* (5) beobachteten bei Mäusen nach Fütterung mit Lebertran eine Jodzahl der Leberfettsäuren, die nicht nur die Jodzahl der Fettsäuren nicht gefütterter Mäuse, sondern auch die Jodzahl der Fettsäuren des *Oleum jecoris aselli* weit übertrifft. Auf dieser Tatsache und auf zahlreichen Analysen des Leberfettes, nach welchen das Leberfett mehr ungesättigte Fettsäuren enthält als das Unterhautfett, die Leberfettsäuren enthalten nach *Hartley* (6) 10 % der Arachidonsäure, das Unterhautfett nur etwa 0,3 % [*Eckstein* (7)], baut *Leathes* seine Hypothese auf, nach welcher der Abbau der Fettsäuren in der Leber mit einer Dehydrogenisation oder Desaturation einsetzt, etwa nach dem Schema:



und weiterer Abbau durch Oxydation und Sprengung der Kohlenstoffkette an der Stelle der Doppelbindung bewirkt wird.

Nach Fütterung mit *Oleum jecoris aselli* kommt *Joannovicz* und *Pick* (8) zu demselben Resultat wie *Leathes* und *Meyer-Wedell*. Die Erhöhung der Jodzahl betrifft das Neutralfett bzw. den acetonlöslichen Anteil der Leberlipide. Bei depankreatisierten Hunden bleibt die Erhöhung der Jodzahl des Neutralfettes aus, dafür aber weisen die Phosphatide dieselbe hohe Jodzahl wie beim gesunden Tiere auf.

Der Einfluß des Pankreashormons auf die Desaturation in der Leber ist also unverkennbar. Die Ansicht, die zuerst von *Lombroso* (9) ausgesprochen wurde, nämlich daß Pankreas über ein spezifisches, den Fettabbau regulierendes Hormon verfügt, ist durch diese Untersuchungen vollkommen begründet.

Die Bedeutung der Desaturation in der Leber besteht also nach *Leathes* in einer Vorbereitung der Fettsäuren zum weiteren Abbau, der in anderen Organen einsetzt. Die Möglichkeit einer solchen Oxydation ist aus der Erhöhung der Acetylzahl der Leberfettsäuren nach der Autolyse [*Kondokono* (10)] ohne weiteres ersichtlich; der Widerspruch mit der experimentell bewiesenen *Knoopschen* β -Oxydation ist eben nur scheinbar. Denn die *Knoopsche* β -Oxydation wurde in Versuchen an überlebenden Lebern bis jetzt nur bei den Säuren bis C_{10} bewiesen. An höheren Fettsäuren konnte sie schon wegen ihrer physikalischen Verhältnisse (Wasserunlöslichkeit) nicht bewiesen werden. Es ist möglich, daß die Desaturation bei den höheren Fettsäuren einsetzt und die lange Kohlenstoffkette in kleinere Bruchstücke gespalten wird, die dann dem weiteren Abbau nach *Knoop* unterliegen.

Den direkten Beweis der Desaturationshypothese suchte *Smith* (11) durch Untersuchung des Verhaltens der durch oxydativen Abbau der

Ölsäure in vitro erhaltenen Abbauprodukte (Azelain- und Pelargonsäure) zu bringen. Es zeigte sich, daß zwar die Pelargonsäure vollkommen, die Azelainsäure aber nur zu 40% im Organismus des Hundes verwertet wird. Es konnte also auf diesem Wege kein direkter Beweis dieser Hypothese erbracht werden. Andererseits kann dieser Umstand nicht gegen die Brauchbarkeit der Hypothese verwertet werden. Denn es müssen ja die Abbauprodukte im Organismus nicht mit denen in vitro identisch sein. Es ist ja keineswegs eine Isomerisation der ungesättigten Fettsäuren vor der Spaltung ausgeschlossen. Die Anwesenheit von 6 bis 7% Ölsäure in der Leber (*Hartley*) spricht wenigstens nicht dagegen.

Einen Beweis für den Einfluß des Pankreas auf den Fettstoffwechsel der Leber brachten die Versuche von *Lombroso, Gentile* (12) u. a. Ihre Resultate lassen sich in Kürze folgendermaßen zusammenfassen: Die überlebende Leber bewirkt bei einem auf der Höhe der Verdauung befindlichen Individuum oder nach einer Infusion der Salzsäure in das Duodenum bei der künstlichen Durchströmung oder aseptischer Autolyse einen Abbau des Fettes (Lipodierese). Dieselben Erscheinungen wurden schon früher von *Roger* und *Binet* (13) am Lungengewebe festgestellt. Bei einem hungernden oder depankreatisierten Tiere bleibt dieser Abbau aus, stellt sich aber ein, wenn das Tier vor dem Tode mit Insulin behandelt wurde.

Der nächste Gedanke wäre doch, daß sich die Fette unter der Wirkung des Pankreashormons in die Kohlehydrate verwandeln, eine Anschauung, die von *Geelmuyden* (14) vertreten wird, die aber bis jetzt am normalen Tiere nicht einwandfrei bewiesen werden konnte. Der Nachweis einer solchen Umwandlung an phlorrhizinvergifteten Tieren ist *Asher* und *Calvo Criado* (15) und insbesondere *Wertheimer* (16) gelungen.

Wertheimer experimentierte an hungernden, mit Phlorrhizin vergifteten Hunden, wobei alle Störungen des Fettstoffwechsels (Hungerlipämie, Leberinfiltration, Acidosis, Glykogenschwund) durch Phlorrhizinvergiftung gesteigert und beschleunigt werden. Der Fetttransport aus der Peripherie unterliegt außer der nervösen Regulation auch einer Regulation durch Inkretstoffe. Die Hunger- und Phlorrhizinlipämie wird durch Insulin gehemmt. Insulin und Adrenalin beschleunigen ebenfalls die Umwandlung der Fette in der Leber, bestehend im Verschwinden der Fettinfiltration, welche mit einer Neubildung des Glykogens verbunden ist. Die Neubildung des Glykogens wird nach *Wertheimer* durch die Umwandlung des Leberfettes in Kohlehydrate verursacht. Bestätigung seiner Ansicht findet *Wertheimer* in der überraschenden Tatsache, daß die phlorrhizinvergifteten Hunde, wo der Glykogengehalt der Leber beinahe gleich Null zu setzen ist, aber dafür eine starke Fettinfiltration besteht, das Insulin viel besser vertragen als die Kontrollhunde, wo der Glykogengehalt doch viel größer sein muß.

Ebenso interessant war die Adrenalinreaktion der Phlorrhizinhunde, bei denen Adrenalin eine weit größere Hyperglykämie bewirkt als bei den Kontrolltieren. Beide Erscheinungen erklärt *Wertheimer* durch den fortwährenden Nachschub von Kohlehydraten, welcher durch die durch Insulin und Adrenalin beschleunigte Umwandlung von Fett in Kohlehydrat bewirkt wird.

Beim pankreatopriven Diabetes läßt sich nach Insulinbehandlung ebenfalls das Schwinden der Fettinfiltration und Neubildung von Glykogen feststellen. Jedoch liegen hier die Verhältnisse nicht so klar, und die Insulin-

wirkung läßt sich nicht einfach definieren. In der ersten Zeit nach Pankreas-exstirpation ist das Insulin imstande, die Leber von der Fettinfiltration zu befreien. Nach längerer Darreichung beobachtete *Allan* (17) (l. c.) degenerative Prozesse in der Leber, die durch neue Fettanlagerung in der Peripherie der Lobuli mit degenerativen Veränderungen der im Zentrum liegenden Zellen ausgedrückt sind, so daß es zu einer beträchtlichen Fettanhäufung in der Leber (39,5% der Trockensubstanz) kommen kann. Das Fehlen dieses Zustandes bei den Diabetikern kann man nach *Allan* durch die hemmende Wirkung des Pankreasrestes erklären.

Der Glykogengehalt der Leber wird beim normalen Individuum durch Insulin stark vermindert. Es fanden z. B. *Dudley* und *Marrian* (18) bei Mäusen nach einer Insulingabe, die Krämpfe bewirkte, in der Mitte nur 0,075% Glykogen gegen 1,76% der Kontrolltiere. Zu ähnlichen Resultaten gelangten auch viele andere, auch wenn das Glykogen vor dem Ausbruch der Krämpfe bestimmt wurde.

Wie schon früher erwähnt, weiß man nichts Sicheres darüber, wie das aus der Leber schwindende Glykogen verwertet wird. Es wurden auch die Möglichkeiten besprochen, nach welchen das Glykogen beim normalen Tiere in andere Substanzen, besonders in Fett, verwandelt wird. Man müßte dann natürlich eine ganz umgekehrte Wirkung des Insulins als beim phlorrhizinvergifteten Tiere annehmen. Die bisherigen Versuche am normalen Tiere scheinen keine Beeinflussung des Fettstoffwechsels durch Insulin in diesem Sinne zu beweisen.

Raper und *Smith* (19) konnten bei Versuchen an dezerebrierten und eviszerierten Katzen bei künstlicher Durchströmung mit Glykoselösung keine Erhöhung des Fettgehalts der Muskel feststellen, trotzdem die erwartete Steigerung des Fettgehalts, entsprechend der angewandten Menge Glucose, etwa 16 bis 20% betragen müßte. Ebenfalls konnten dieselben Autoren bei den Mäusen keine Änderung des Gesamtfettgehalts nach Insulin feststellen.

Dudley und *Marrian* haben bei Mäusen nach Insulindarreichung keine Veränderungen des Leberfettgehalts und der Jodzahl nachgewiesen.

In Erwägung der Versuche von *Joannowicz* und *Pick*, *Lombroso*, *Wertheimer* usw. ist es aber sehr unwahrscheinlich, daß der Fettstoffwechsel der Leber bei normalen Tieren durch Insulin gar nicht beeinflusst wäre. Mit Rücksicht auf die Versuche an depankreatisierten Tieren möchte man auch beim normalen Tiere eine Erhöhung des Fettstoffwechsels erwarten. Aus diesem Grunde haben wir uns entschlossen, ähnliche Versuche wie *Dudley* und *Marrian* auszuführen.

Als Kriterium des Fettzerfalles haben wir die Jodzahl gewählt, und zwar nur die Jodzahl. Der Prozentgehalt des Fettes der Leber ist scheinbar unserer Ansicht nach nicht ganz maßgebend, um erkennen zu können, ob sich das Fett im Stadium eines schnellen oder langsamen Zerfalles befindet. Dies ist ganz gut aus *Mottrams* Versuchen (20) ersichtlich, die die Menge und Jodzahl des Fettes bei verschiedenen lange hungernden Tieren (Meerschweinchen) verfolgen. Wie aus dem unten angeführten Auszug aus einem Protokoll *Mottrams* ersichtlich ist, weist eben das Tier mit maximalem Fettgehalt einen bedeutenden Anstieg

der Jodzahl auf, was auf den Beginn des Zerfalles schließen läßt, welcher sich bei dem um einen Tag länger hungernden Tiere durch eine bedeutende Verminderung des Fettgehaltes mit hoher Jodzahl kundgibt.

Dauer des Hungerns Tage	Fettsäure %	Jodzahl	Dauer des Hungerns Tage	Fettsäure %	Jodzahl
0	2,17	95,52	1	5,08	77,64
0	2,55	98,15	2	14,64	103,7
0	3,09	—	3	5,24	135,5

Das Insulin, welches wir bei unseren Versuchen benutzten, war ein im hiesigen Institut für experimentelle Pathologie nach der Methode *Dodds* und *Dickens* (21) dargestelltes Präparat.

Zu den Versuchen wurden möglichst gleich große Tiere genommen, die schon längere Zeit im Institut für experimentelle Pathologie waren und gleich gefüttert wurden. Die Kontrolltiere bekamen mit den Versuchstieren dieselbe Nahrung bzw. haben gleich lange Zeit gehungert. Das Insulin wurde subkutan appliziert (nur im Falle Nr. 16 intraperitoneal).

Die Tiere wurden 3 Stunden nach der Insulininjektion durch Ausbluten getötet. Die Leber wurde sofort nach dem Tode herausgenommen, vom anhaftenden fremden Gewebe befreit, und die ganze Leber durch eine feine Hackmaschine getrieben. Der dünne Brei wurde dann noch in einer Reibschale fein zerrieben. Zur Analyse wurden von diesem Brei etwa 5 g genommen.

Die Fettbestimmung geschah zuerst nach der Methode *Kumagawa-Suto*. Nachdem aber bei dieser Methode die Doppelbindungen bei der Hydrolyse des Gewebes mit Lauge einer großen Gefahr der Polymerisation und Oxydation ausgesetzt sind, haben wir uns später der Methode von *Lemeland* (23) bedient.

Eine abgewogene Menge Substanz wird im Extraktionsapparat nach *Kumagawa-Suto* 8 Stunden lang mit 96%igem Alkohol extrahiert. Der alkoholische Extrakt wird im Vakuum bei gelindem Erwärmen zur Trockene verdampft und der Rückstand mit 25 ccm 2 n alkoholischer Kalilauge 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Danach gibt man 14 ccm n Salzsäure, 28 ccm Wasser und 28 ccm 96%igen Alkohol hinzu und erhitzt noch weitere 15 Minuten, um die bei der Säurezugabe eventuell in Freiheit gesetzten Fettsäuren wieder zu neutralisieren. Die Lösung ist nun in bezug auf das Alkali etwa n/10.

Die alkalische Lösung wird dreimal mit Petroläther ausgeschüttelt, wodurch das ganze Unverseifbare entfernt wird. Die petrolätherischen Auszüge werden zur Trockene verdampft, bei 60° getrocknet und von neuem im wasserfreien Petroläther gelöst. Die Lösung wird nun durch Asbest in ein tariertes Becherglas filtriert, im Vakuum vom Petroläther befreit, bei 60° getrocknet und gewogen. Die vom Unverseifbaren befreite Seifenlösung extrahiert man nach dem Ansäuern mit Salzsäure viermal mit je 100 ccm Petroläther, und die petrolätherische Lösung der Fettsäuren wird nun in derselben Weise wie die des Unverseifbaren weiter bearbeitet. Das Abdestillieren von Petroläther wurde immer im CO₂-Strome ausgeführt.

Die Bestimmung der Jodzahl geschah nach *Rosenmund-Khuhenn* (24)¹. Das Blut zur Blutzuckerbestimmung haben wir unmittelbar vor dem Tode des Tieres entnommen. Der Blutzucker wurde nach *I. Bang* bestimmt.

Die Resultate der Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Nr.	Tier	Insulin	Blutzucker	Fettsäuren % des frischen Gewebes	Jodzahl	Zustand des Tieres	Methode der Fettbest.
1	Ratte	θ	0,09	4,3	114	24 Stunden gehungert	Kumagawa-Suto
2	"	20 T.-E.	0,024	3,65	105,9		
3	"	θ	0,122	4,9	133,9		
4	"	20 T.-E.	0,07	3,3	130,1	24 Stunden gehungert, dann 5 ccm Ol. jecoris aselli	
5	"	20 "	0,045	2,3	124,8		
6	"	20 "	0,06	4,6	119,8		
7	"	20 "	0,08	5,7	95,7		
8	"	θ	—	2,98	75,9	24 Std. ge- hung., dann 5 g Zucker	
9	"	20 T.-E.	—	2,16	78,1		
10	"	θ	0,124	3,4	135,6	24 Stunden gehungert	Lemland
11	"	20 T.-E.	0,085	4,5	124,9		
12	Hund	θ	0,09	3,31	99,1	3 Tage gehungert	
13	"	20 T.-E.	0,037	2,99	86,0		
14*	"	20 T.-E. (Welcome)	0,029	2,74	112,9	3 Tage ge- hung., dann 500 g Fleisch 1 Std. vor der Injektion	
15	Meerschweinch.	θ	—	4,82	91,37	3 Tage gehungert	
16	"	30 T.-E. (intraperit.)	—	2,14	98,4		
17	"	θ	—	2,38	102,7	Normal	
18	"	40 T.-E.	—	2,99	93,8	gefüttert	

* Dieser Versuch wurde zu einem anderen Zwecke ausgeführt. Wir führen ihn nur deshalb an, weil hier nach gleicher Menge von Insulin Welcome, die 20 Einheiten entspricht, sehr heftige Krämpfe auftraten, in welchen das Tier getötet wurde. Sonst wurden in keinem Falle Krämpfe beobachtet.

Anmerkung: Unter Insulineinheit (T.-E.) ist die alte Torontoeinheit zu verstehen.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, kann man bei den Ratten, die mit Oleum jecoris aselli gefüttert wurden, von keiner erhöhten Desaturation sprechen, im Gegenteil, die Jodzahlen der Insulintiere sind niedriger als diejenigen der Kontrolltiere. Die Menge des Fettes ist im Versuch 3 und 7 am größten. Jedoch weisen beide Fette beträchtliche Unterschiede der Jodzahl auf.

¹ Die Fettsäuren, deren Menge etwa 0,1 bis 0,2 ccm betrug, wurden in 10 ccm Chloroform gelöst und 25 ccm der Pyridinsulfatdibromidlösung zugesetzt. (8 g Pyridin und 10 g konzentrierte Schwefelsäure werden gesondert unter Kühlung in je 20 ccm Eisessig gelöst, dann zusammen- gemischt und 8 g Brom in 20 ccm Eisessig zugegeben; die Lösung wird auf 1 Liter aufgefüllt.) Nach 5 Minuten wurde nach Zugabe von 10 ccm einer 10%igen Kaliumjodidlösung zurücktitriert, zum Schluß nach Zugabe von Stärkelösung und etwa 30 ccm Wasser.

Ebenfalls kann man bei den hungernden Ratten nach Insulin eine deutlich niedrigere Jodzahl beobachten. Bei der Fütterung mit Kohlehydraten wurden in beiden Fällen (Versuch 8 und 9) niedrige Jodzahlen gefunden. Bei den beiden Hunden ist ebenfalls der Unterschied der Jodzahlen ganz deutlich, ebenso bei den Meerschweinchen 17 und 18. Bei hungernden Meerschweinchen ist im Gegenteil die Jodzahl beim Insulintier etwas höher, was gegen die übrigen Resultate zu sprechen scheint. Jedoch kann dieser Umstand sehr leicht erklärt werden. Denn gerade beim Meerschweinchen und Kaninchen kommt im Hunger, wie *Mottram* bewiesen hat, eine Lipämie und eine beträchtliche Fettleber zustande, die natürlich mit einer Erniedrigung der Jodzahl der Leberfettsäuren verbunden ist. Dieser Fetttransport wird aber durch Insulin gehemmt; es ist also durch Insulin ein die Jodzahl der Leberfettsäuren s. v. v. mechanisch erniedrigendes Moment beseitigt, was selbstverständlich einen erhöhten Abbau des Leberfettes simulieren könnte, der jedoch auf gleicher Höhe wie beim normalen Tiere oder sogar gehemmt sein kann.

Fassen wir nun die Resultate unserer Versuche zusammen, tritt aus dem Vergleich der Jodzahlen der Leberfettsäuren mit und ohne Insulin deutlich hervor, daß die Desaturation des Leberfettes durch Insulin keineswegs beschleunigt wird, ja sogar im Gegenteil, nachdem die Jodzahlen niedriger liegen und nachdem man in Erwägung ziehen muß, daß durch Insulin der Fetttransport von der Peripherie gehemmt wird, muß eine hemmende Wirkung des Insulins auf die Desaturation des Leberfettes angenommen werden.

Die Erscheinung ist an und für sich sehr überraschend, denn sie bedeutet eine mehrphasige bzw. eine ganz umgekehrte Wirkung des Insulins als beim diabetischen oder mit Phlorrhizin vergifteten Organismus.

Man müßte dem Insulin mindestens zwei Fähigkeiten zuschreiben: Erstens die beschleunigende Wirkung auf den Fettabbau und Umwandlung des Fettes in Kohlehydrate (beim diabetischen Tiere), zweitens, und zwar bei normalen Tieren, eine den Fettabbau hemmende Wirkung.

Bei dieser Gelegenheit machen wir noch auf die schon früher erwähnten Erfahrungen *Allans* aufmerksam, nach welchen die nach Pankreasexstirpation eintretende Fettinfiltration der Leber in der ersten Zeit der Insulinbehandlung verschwindet, um dann später nach protrahierter Insulinbehandlung neuen, mit einer eigenartigen Fettinfiltration verbundenen degenerativen Erscheinungen Platz zu machen.

Die Erniedrigung der Jodzahl des Leberfettes könnte aber noch anders gedeutet werden, und zwar als Ausdruck einer Fettbildung aus Nichtfetten, besonders aus Kohlehydraten. Eine Begründung hätte diese Ansicht in der Arbeit *Lublins* (25), welche auch die Frage

der Insulinmastkuren berührt. *Lublin* hat festgestellt, daß der Respirationsquotient beim Nichtdiabetiker ebenso rasch ansteigt, wenn man 100 g Glucose oder Lävulose mit oder ohne Insulin darreicht. Erst nach Beibehaltung bestimmter Bedingungen, nämlich beim Darreichen einer bestimmten Menge Kohlehydrate, die an und für sich den Respirationsquotienten nicht über 1 zu steigern imstande war, stieg der Respirationsquotient bei Applikation von Insulin über 1. Diese Erscheinung ist nach *Lublin* als Ausdruck einer Bildung von Fett aus Kohlehydraten zu fassen.

Diese Erwägungen sind im Widerspruch z. B. mit den Versuchen *Wertheimers*. Es ist aber jedenfalls anzunehmen, daß sich die Wirkung des Insulins im phlorrhizinvergifteten Organismus anders gestalten wird als beim gesunden Individuum. Nach vielen Angaben kann man auch den kleinen Insulindosen andere Wirkung zuschreiben als größeren Dosen. Bekanntlich schwindet das Glykogen nach größeren Dosen von Insulin aus der Leber. Andererseits geht aus der Arbeit von *Frank, Hartmann* und *Nothmann* (26) hervor, daß kleine Insulindosen zu einer Glykogenablagerung oder vielleicht richtiger gesagt, zu einer Glykogenbildung in der Leber beim hungernden Tiere Veranlassung geben.

Diese Mannigfaltigkeit der Insulinwirkungen wäre unter der Betrachtung des Insulins als ein Gemisch von mehreren wirksamen Stoffen leicht erklärbar. Nach *Gentile* (27) muß man im Insulin einen auf den Fettstoffwechsel selbständig wirkenden Faktor anerkennen. Es ist natürlich schwer zu sagen, ob diese Wirkungen einem einzigen oder mehreren Stoffen zuzuschreiben sind.

Auf Grund unserer Versuche können wir natürlich nur von einer Hemmung des Fettabbaues sprechen. Um der Frage des Verhaltens der Fette in der Leber nach Insulin etwas näher zu kommen, befassen wir uns mit den Veränderungen des Fettes während der Autolyse. Wie erwähnt, ist die Autolyse des Lebergewebes auf der Höhe der Verdauung mit einer Fettabnahme verbunden, bei einem hungernden oder pankreaslosen Tiere bleibt der Fettgehalt unverändert, oder wird sogar etwas erhöht. Nun haben wir bei mit Insulin vorbehandelten hungernden Tieren während der ersten Stunden der Autolyse eine Fettzunahme um bis 20 % des Anfangswertes beobachtet, wonach man auf eine Tendenz zur Fettbildung nach Insulin schließen müßte. Die Versuche werden fortgesetzt.

Literatur.

- 1) *B. Dickson, G. Eadie, J. Macleod, F. Pember*, Amer. Journ. Phys. **68**, 1924; zit. nach *Grevenstuk* und *Laqueur*, Ergebn. d. Physiol. **23**, II, 120. — 2) *V. Laufberger*, Klin. Wochenschr. 1924, Jg. 3, S. 264. — 3) *J. Needham, W. Smith, L. Winter*, Journ. of Physiol. **57**, 1923. — 4) *Knoop*, Hofmeisters Beitr. **6**, 150, 1904. — 5) *Leathes, Meyer-Wedell*, Journ. of Physiol.

- 38, Proc. XXXVIII, 1909. — 6) *Hartley*, ebendasselbst 38, 353, 1909. — 7) *Eckstein*, Journ. of biol. Chem. 64, 797, 1925. — 8) *Joannovicz* und *Pick*, Wiener klin. Wochenschr. 16, 573, 1910. — 9) *Lombroso*, Arch. f. intern. Physiol. 23, 321, 1924. — 10) *Kondo Konro*, diese Zeitschr. 26, 252, 1910. — 11) *Smith*, Journ. of biol. Chem. 67, XXVII, 1926; zit. nach Ber. d. ges. Phys. 36, 753. — 12) *Gentile*, Arch. f. intern. Physiol. 23, 357, 1924. — 13) *Roger, Binet, Le Blanc*, Scand. Arch. Physiol. 49, 215, 1926. — 14) *Geelmuyden*, Ergebn. d. Physiol. 21, 274. — 15) *Asher, Calvo Criado*, diese Zeitschrift 164, 76, 1925. — 16) *Wertheimer*, Pflügers Arch. 213, 298, 1926. — 17) *F. Allan, Bowie, Macleod, Robinson*, Brit. Journ. f. exper. Pathol. 5, 75, 1924. — 18) *Dudley, Marrian*, Biochem. Journ. 17, 435, 1923. — 19) *Raper, Smith*, Journ. of Physiol. 60, 41, 1925; zit. nach Ber. d. ges. Phys. 32, 546. — 20) *Mottram*, Journ. of Physiol. 38, 308, 1909. — 21) *Dodds, Dickens*, Brit. Journ. f. exper. Pathol. 5, 115, 1924. — 22) *Lemeland*, C. r. Soc. Biol. 2, 500, 1922. — 23) *Rosenmund-Khuhenn*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 46, 154, 1923. — 24) *Lublin*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 115, 101, 1926. — 25) *Frank, Hartmann, Nothmann*, Klin. Wochenschr. 1925, Jg. 4, S. 1067, 1925. — 26) *Gentile*, Arch. f. intern. Physiol. 26, 280, 1926.
-

Untersuchungen über die Giftwirkung der Chininkörper auf das Gärvermögen lebender Hefe.

Von

P. Rona und H. W. Nicolai.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität
Berlin, Charité.)

(Eingegangen am 9. August 1927.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

1. Versuchsmaterial.

In den Versuchen stand uns eine abgepreßte untergärige Hefe der Lehr- und Versuchsbrauerei Berlin zur Verfügung, die auf 10- bis 14%iger Bierwürze bei 25° weitergeführt oder direkt in dem uns gelieferten Zustande verbraucht wurde. Bei der Bestimmung der quantitativen Giftwirkung wurden die jeweiligen Giftmengen auf das Frischgewicht der Hefe bezogen. Die im letzten Abschnitt dieser Mitteilung beschriebenen Luft- und Kahmhefen wurden ausschließlich auf eigenen Würzenährböden in großen Petrischalen gezüchtet, die Kulturen nach 24 Stunden Brutzeit (25°) in Zentrifugengläser ausgegossen und das Zentrifugat mit Acetatpuffer ($p_H = 5,3$) nochmals gewaschen. Von der auf diese Weise erhaltenen Hefesubstanz wurden dann abgewogene Mengen für die Versuche in Pufferlösungen suspendiert. Eine häufige bakteriologische Kontrolle ergab die Abwesenheit nennenswerter Mengen von Bakterien in sämtlichen Kulturen.

2. Methodik.

Die Messung der Gärung und der Atmung wurde mit der von Warburg angegebenen Apparatur unter Verwendung der Gefäße nach Nicolai¹ ausgeführt, in denen die Hefesuspension und die Substratlösung getrennt eingefüllt und erst nach Temperatúrausgleich durch zehnfaches Hin- und Hergießen durchgemischt wurden. Als Substrat diente ausschließlich Glykose in den später angegebenen Konzentrationen. Bei den Versuchen, die die Beobachtung allein der Gärung bezweckten, wurde die strenge Anoxybiose durch vorheriges Überleiten der zur Gasfüllung benutzten 5%igen CO_2 in N_2 über glühendes, frisch reduziertes Kupfer gewährleistet.

3. Orientierende Versuche.

Die untergärige Hefe wurde zunächst auf ihre Atmung hin untersucht, indem eine frische Suspension in 5%iger Glykoselösung ($p_H = 5,3$) in die Gefäße und eine 30%ige Kalilauge in die Retorten eingefüllt wurde. Eine Reihe weiterer Gefäße ohne Alkali und mit CO_2 -Füllung

¹ Vgl. P. Rona, Prakt. d. physiol. Chem. 1, 106.

erlaubte gleichzeitig, die Gärfähigkeit zu messen. Während in den anaeroben Versuchen binnen einer Stunde mehrere Hundert Kubikmillimeter CO_2 produziert wurden, sank der Druck in den mit Luft gefüllten Gefäßen nur um wenige Millimeter, entsprechend einem minimalen Sauerstoffverbrauch (Tabelle I, Gefäß 26). Auch ohne Glykosezusatz ist unter anaeroben Bedingungen eine starke Gärung zu beobachten, die aus dem Abbau der Zellkohlehydrate herrührt und auch durch mehrfaches vorheriges Waschen der Zellen nicht beseitigt werden kann. Indessen scheint der Vorrat an diesem Gärmaterial nicht übergroß zu sein, denn die Geschwindigkeit der Gasbildung sinkt in diesem Falle alsbald ab.

Da bei den in Aussicht genommenen Vergiftungen es kaum zu erwarten war, an verschiedenen Tagen völlig gleiche Hefemengen zu einem Versuch zu treffen, wurden in einer Reihe weiterer Vorversuche die Beziehungen zwischen der Zellkonzentration, Substratkonzentration usw. ermittelt. Die Gärung in einer 3%igen Glykoselösung wird hierbei als proportional zur Menge der vorhandenen Hefe gefunden (Tabelle II). Läßt man die Hefemenge unverändert und wechselt nur die Zuckerkonzentration in einem Bereich zwischen 200 und 1000, so ist von 200 abwärts eine Abnahme der bis dahin konstanten Gärgeschwindigkeit festzustellen (Tabelle I). Schließlich wurde, mit den Angaben der Literatur übereinstimmend, ein p_{H} -Optimum zwischen 4,5 und 6,5 in der Weise gefunden, daß in einer Reihe von Paralleluntersuchungen nur die Pufferflüssigkeit geändert wurde (Tabelle III bis V, Abb. 2).

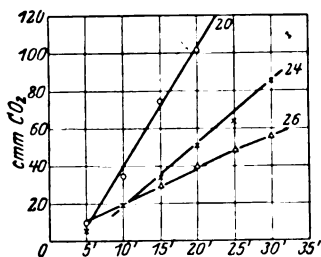


Abb. 1.

Gärung bei verschiedener Hefekonzentration in 3% Glykose.

Gefäß 20 Hefekonzentration $\frac{1}{1}$
 " 24 " $\frac{1}{2}$
 " 26 " $\frac{1}{4}$.

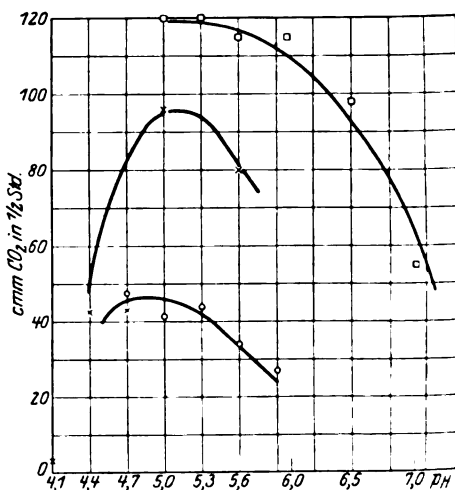


Abb. 2.

Darstellung der Gärgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom p_{H} .

4. Die Methodik der Chininvergiftung.

Selbst bei völliger Sättigung der Glykoselösung mit Chininhydrochlorid gelingt es nicht, nach der bisherigen Versuchsanordnung auch nur die geringste Vergiftung der Gärungsfermente zu erhalten (Tabelle VI). Der Grund hierfür ist in dem Mangel an freier Base zu suchen¹, die erst bei höheren p_H -Werten existenzfähig ist. Wechselt man die Pufferlösungen, indem man von $p_H = 5,3$ allmählich über 5,6, 5,9 zu 6,2 übergeht, so tritt eine Hemmung bis zu 20 % ein. Ein weiteres Fortschreiten in der Pufferreihe hätte keinen Zweck, da die Grenze des Optimums für die alkoholische Gärung nahezu erreicht ist und die Abnahme der Gärgeschwindigkeit nicht allein mehr eine Folge der Vergiftung sein würde.

Um die Schwierigkeiten zu beseitigen, die für eine Untersuchung über die Giftwirkung darin liegen, daß das Optimum der Fermentwirkung und der Fermentvergiftung durch mehrere p_H -Einheiten voneinander getrennt sind, hat sich nach einer Reihe von Versuchen folgende Methodik als geeignet und einwandfrei erwiesen. Aus einer Lösung des Chininsalzes wird die Base vorsichtig durch Bicarbonat frei gemacht, mit dieser sehr wirksamen Lösung dann die Hefe bei einem $p_H = 7,5$ bis 8,0 vergiftet und später die Gärung bei ihrer optimalen Reaktion $p_H = 5,3$ gemessen.

0,2 g Chininhydrochlorid werden in 50,0 ccm Wasser gelöst, von dieser Stammlösung 10 ccm mit einer kalt gesättigten NaHCO_3 -Lösung vorsichtig tropfenweise bis zum Auftreten einer schwach opalisierenden Trübung versetzt — es sind etwa 0,5 ccm hierzu nötig — und mit weiteren 0,5 ccm Alkali und mit Wasser auf 20 ccm aufgefüllt. Durch Verdünnung mit dem Faktor 3,16 erhält man sodann eine Reihe mit den Chininkonzentrationen

$$5 \cdot 10^{-3}, 1,55 \cdot 10^{-3}, 5 \cdot 10^{-4}, 1,55 \cdot 10^{-4}, 5 \cdot 10^{-5},$$

die selbstverständlich durch Ersatz der bei der Verdünnung gesunkenen Bicarbonatkonzentration mit Bicarbonat alle auf das gleiche p_H gebracht werden müssen, was man am besten durch Tüpfeln auf Phenolrotpapier kontrolliert. Ein sechstes Glas dient zur Kontrolle und enthält nur 19 ccm Wasser + 1 ccm NaHCO_3 -Lösung. In einem Philippsbecher werden 3,2 g Hefe auf 20 ccm mit Wasser aufgefüllt und zu einer völlig homogenen Suspension durch energisches Schütteln verteilt, sodann durch ein weiches Filter oder Musselintuch gegossen und in jedes der sechs obigen Gläser 3 ccm des Filtrats (= 0,48 g) eingefüllt. Unter häufigem Umschwenken bleiben diese Gläser stehen, und durch Zugabe von je 17 ccm Acetatpuffer ($p_H 5,3$) wird zur gleichen Zeit die Vergiftung in der ganzen Reihe abgebrochen. Von jedem einzelnen Ansatz werden 20 ccm (= 0,24 g Hefe) zentrifugiert, die überstehende klare Lösung abgegossen, das Zentrifugat im Zentrifugenglas mit Acetatpuffer 5,3 auf 3,0 ccm aufgefüllt, wieder homogen verteilt

¹ Vgl. P. Rona und E. Bloch, diese Zeitschr. 118, 185, 1921.

und schließlich von dieser neuen Suspension 0,5 ccm (= 0,04 g Frischgewicht) in die Retorte eines Gefäßes eingefüllt.

Prüft man die Gärung einer auf diese Art bei schwach alkalischer Reaktion vergifteten und dann vom Gift einmal durch Ansäuern, dann auch durch Waschen befreiten Hefe, so ist zunächst klar zu erkennen, daß das Chinin bei den verschiedenen Konzentrationen während der Dauer der alkalischen Reaktion eine verschieden starke Hemmung bewirkt hat (Tabelle VII, Abb. 3). Trägt man diese als Funktion der

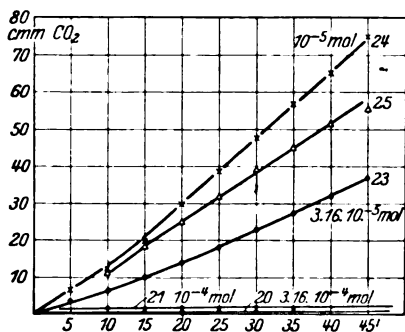


Abb. 3.
Chininvergiftung der alkoholischen Gärung
bei p_H 7,5 bis 8,0.

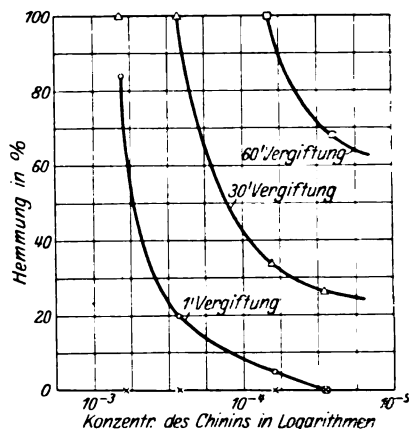


Abb. 4.
Hemmung der Gärung in Abhängigkeit
von der Dauer der Vergiftung.
○ (Tab. X). △ (Tab. IX). □ (Tab. VIII).

Giftkonzentration in ein Koordinatensystem ein, so ergibt sich eine Kurve nach Abb. 4, Tabelle VIII bis X. Während also das Alkaloid selbst in den höchsten Konzentrationen keine Wirkung entfaltete, hemmt die freie Base noch in Konzentration von 10^{-4} bis 10^{-5} molar. Die als Vergleich herangezogene Gärungsgeschwindigkeit der unvergifteten Hefe im sechsten Gefäß einer jeden Versuchsreihe stellte sich anfangs als eine schwankende, zum Teil sogar den schwächer vergifteten Ansätzen unterlegene Größe (s. Abb. 3, Gefäß 25) dar; es ergab sich bei der Nachprüfung dieser Unstimmigkeit, daß es unbedingt nötig ist, auch die Kontrolle vorübergehend bei alkalischer Reaktion zu belassen, weil diese Vorbehandlung erst ihr die maximale Gärfähigkeit verleiht.

Diese Beobachtung einer „Aktivierung“ bedurfte noch einer weiteren Prüfung. War die Steigerung der Gärgeschwindigkeit nur von der Wasserstoffzahl während der Vorbehandlung abhängig? Oder spielte auch die Dauer der zeitlichen Einwirkungen eine Rolle? Wenn

man eine Hefesuspension in der oben beschriebenen Art in Wasser suspendiert, das Bicarbonat enthält, und dann nachträglich durch Zufügen eines sauren Acetatpuffers die Reaktion umkehrt, so ergibt sich bei der Prüfung der Gärung, daß es für die Aktivierung vollkommen gleichgültig ist, ob das Bicarbonat eine Minute oder eine Stunde eingewirkt hat; die CO_2 -Bildung erfolgt unabhängig von der Dauer der vorausgegangenen Bicarbonatbehandlung in allen Gefäßen mit derselben Geschwindigkeit. Die Veränderung muß also sehr schnell vor sich gegangen sein.

Einen besseren Einblick in die vorliegende Frage geben eine Reihe von Versuchen, bei denen jedesmal während der gleichen Zeit von 10 Minuten aber bei verschiedenem p_{H} die gleiche Hefemenge „aktiviert“ und dann manometrisch auf ihre erhöhte Leistungsfähigkeit hin geprüft wurde. Dabei zeigte es sich, daß zwischen den einzelnen Versuchen zum Teil beträchtliche Differenzen bestehen, die indessen einen „Gang“ haben: Je alkalischer innerhalb gewisser Grenzen die Vorbehandlung war, desto größer ist die Aktivierung. Wird die maximal erreichte Leistung willkürlich als 100 bezeichnet, so können die anderen in Prozenten der maximalen ausgedrückt und als Funktion der Wasserstoffionenkonzentration der Vorbehandlung dargestellt werden, wobei sich eine Dissoziationsgradkurve mit der wahrscheinlichen Dissoziationskonstante 6,6 bis 6,8 ergibt (Abb. 5). Dieser Umstand legt die Vermutung nahe, daß die Bildung des Glykosephosphats, dessen Bedeutung für die alkoholische Gärung bekannt ist, die Ursache der Aktivierung ist¹.

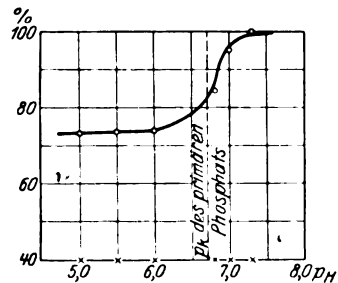


Abb. 5.
Leistungssteigerung der Hefe durch Vorbehandlung bei verschiedenem p_{H} . (Glykosephosphorsäurebildung.)

Es sei noch erwähnt, daß etwas gealterte Preßhefen, die bereits 6 bis 8 Tage im Eisschrank standen, keiner so großen Steigerung der Gärgeschwindigkeit durch Alkalisierung mehr fähig waren wie eine frische, und daß ferner die Unterschiede zwischen einer vorher mit Bicarbonat behandelten und einer nicht behandelten nach ein- bis zweistündiger Gärung sich selbst ausglich.

5. Die Vergiftung der Gärung mit Chininkörpern².

Die bisher beschriebene Methodik ermöglicht, das Chinin in beliebigen Konzentrationen bei dem für die Giftwirkung optimalen p_{H}

¹ Euler und Nordlund fanden als Optimum der Zymophosphatbildung 6,2 bis 6,6, Zeitschr. f. physiol. Chem. 116, 229, 1921; Myrbäck fand bei Versuchen mit Trockenhefe ein Optimum von 6,2 bis 6,8, ebendasselbst 189, 30, 1924; vgl. auch H. Euler und K. Myrbäck, ebendasselbst 181, 179, 1923.

² Vgl. hierzu auch W. Schoeller und M. Gehrke, diese Zeitschr. 172, 358, 1926.

auf gleiche Hefemengen einwirken zu lassen, die Dauer dieser Vergiftung zeitlich genau zu begrenzen und die „Induktionszeit“ auf ein Minimum abzukürzen. Die Vergiftung des „Gärungsfermentes“ ist außer von der Konzentration des Chinins auch von der Dauer der Chininwirkung abhängig, wie aus folgendem Versuch hervorgeht, bei dem sämtliche Gefäße die gleiche Menge Hefe und Alkaloid enthielten (vgl. die Tabellen VIII, IX, X, XI, XII und die Abb. 4 und 6), bei denen aber nach verschiedenen Zeiten — 1, 3, 10, 30 bzw. 60 Minuten nach der Herstellung der Chinin-Hefe-Mischung — die allein wirksame Base durch Hinzufügen des Acetatpuffers in das unwirksame Salz umgewandelt wurde. Tabelle 11 und 12 enthält das Protokoll zweier dieser Versuche, die übereinstimmend zeigen, daß erst nach 30 bis 60 Minuten die maximale Hemmung erreicht ist. Abb. 6 stellt diese Hemmung in Prozenten der maximal nach Ablauf der nötigen Zeit erreichbaren in Abhängigkeit von der Zeit dar. Verändert man überdies noch die Chininkonzentration, so ergibt sich eine Schar von Kurven (Abb. 4).

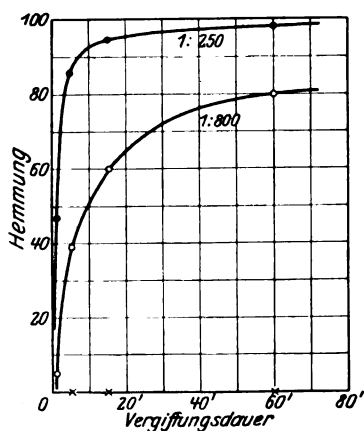


Abb. 6.

Abhängigkeit der Hemmung von der Vergiftungsdauer.

● (Tab. 11). ○ (Tab. 12).

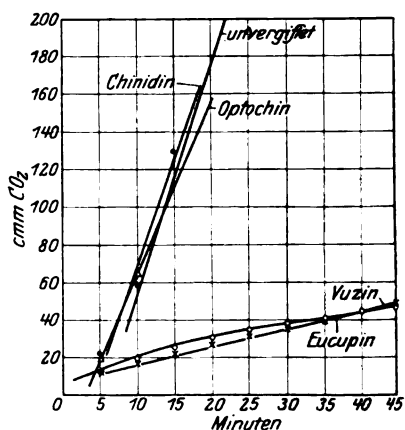


Abb. 7.

Vergiftung der Gärung durch verschiedene Chininkörper bei p_H 5,0 ohne vorherige Alkalisierung (Tab. 13).

Giftkonzentration $2 \cdot 10^{-3}$ molar.

Es ist nicht möglich, dieses Verfahren bei allen Chininkörpern anzuwenden, um Vergleiche hinsichtlich der verschiedenen Giftwirkung einzelner Chinaalkaloide zu ziehen. Ein einfacher Versuch (Tabelle XIII, Abb. 7) zeigt, daß man von den vier Substanzen Chinidin, Optochin, Eucupin und Vucin, von denen die beiden ersten als Hydrochloride, die letzteren als Bihydrochloride in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ molar angewandt wurden, Eucupin und Vucin auch ohne die bisher angewandte vorherige Alkalisierung die Gärung ganz beträchtlich

hemmen, Chinidin und Optochin indessen bei einem p_H von 5,0 offenbar keine nennenswerte Giftwirkung besitzen. Um die einzelnen Verbindungen vergleichen zu können, muß man also zunächst die für die Gärungshemmung optimale Azidität kennen.

Wenn man annimmt, daß die Oberflächenaktivität der Chininbasen im Zusammenhang mit der Gärungshemmung steht, so bietet die Tropfenanalyse ein bequemes Hilfsmittel, um zu einer zunächst orientierenden Übersicht über die vier genannten Stoffe zu gelangen. Die sehr verschiedenen Löslichkeitsverhältnisse ermöglichen es leider nicht, alle Lösungen isomolar zu machen. Vucin kann bei den Tropfenanalysen höchstens in einer Konzentration von 0,1/220 durch die ganze Skala der p_H -Werte hindurch verwandt werden, ohne bei alkalischeren Werten grob auszufallen, oder eine Gallerte¹ zu bilden. Dagegen wurden die anderen Körper in einer Konzentration von 0,2/50,0 angewandt, weil speziell bei Chinin und Chinidin eine dem Vucin isomolare schwächere Lösung keine deutlichen Tropfkurven mehr ergab. Der Untersuchung wurde nach der alkalischen Seite zu in einigen Fällen durch die Gelbildung eine Grenze gesetzt, namentlich das Optochin ließ sich gar nicht nach dieser Methode behandeln. Auf der sauren Seite entstehen dadurch Störungen, daß die Essigsäure des Puffers ihrerseits eine oberflächenaktive Wirkung besitzt, deren Größe in reiner Pufferlösung zunächst ermittelt und von dem Befund an der Alkaloidlösung abgezogen wurde. Dieses Verfahren besitzt nur eine annähernde Genauigkeit, es ist aber zu berücksichtigen, das von p_H 4,4 ab dieser störende Einfluß der Pufferlösung überhaupt aufhört.

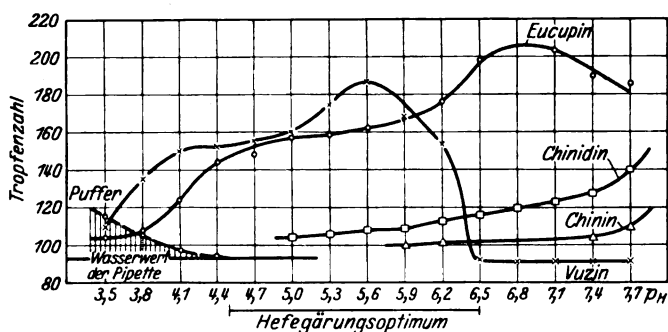


Abb. 8.

Tropfenanalyse verschiedener Chininkörper. Der schraffierte Bereich stellt den durch die Oberflächenaktivität der freien Pufferessigsäure bedingten Fehler dar.

Die Ergebnisse sind in Abb. 8 dargestellt. Die Tropfenanzahl der reinen Pufferlösung, die nur auf der sauren Seite von p_H 4,4 über den Wasserwert 94 der benutzten Pipette hinausgeht, ist in gestrichelter Linie eingezeichnet. Die Kurve des Vucins und des Eucupins kennzeichnen deutlich den zwei-basischen Charakter dieser Alkaloide, deren erstes Basenäquivalent bei

¹ Vgl. hierzu P. Rona und M. Takata, diese Zeitschr. 134, 97, 1922.

4,4 bzw. 5,3, und deren zweites bei 5,6 bzw. 6,8 frei wird. Dieser Umstand macht es erklärlich, warum (Abb. 7) schon bei p_H 5,0 eine weitgehende Vergiftung der Gärung eintritt. Ein Vergleich mit dem unter der Abszisse verzeichneten Optimum der Gärung (Euler¹) zeigt, daß beim Vucin die Befreiung beider, beim Eucupin die des ersten Basenäquivalents in den Bereich dieses Optimums fällt. Die Kurven des Chinins und des Chinidins beginnen, übereinstimmend mit den bisherigen experimentellen Erfahrungen, erst beim Neutralpunkt zu steigen, sie lassen sich wegen des starken Flockens bzw. der Gallertbildung nicht weiter verfolgen.

Die weitere Prüfung der Chininalkaloide wurde an sogenannten wilden oder Kahlhefen vorgenommen, die im Gegensatz zur Bierhefe

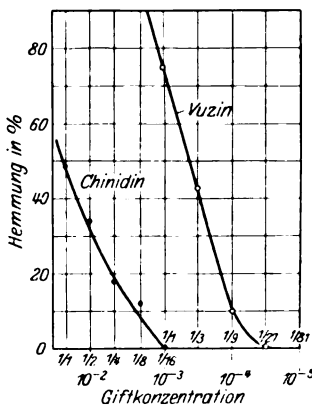


Abb. 9.

Hemmung der Gärung bei wilder Hefe in Abhängigkeit von der Giftkonzentration.
(Tabelle 14 und 15) p_H 5,3.

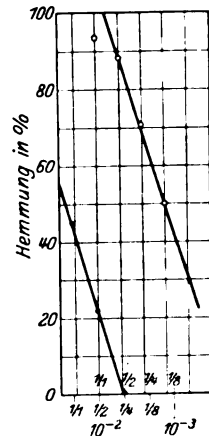


Abb. 10.

Optochin. Abhängigkeit d. Hemmung von der Giftkonzentration.
(Tabelle 17 und 18.)

● (Tabelle 17). ○ (Tabelle 18).

bei Gegenwart von Sauerstoff auch atmet, in der strengen Anoxybiose sich indessen von diesen nicht unterscheidet. Ein orientierender Vorversuch (Tabelle XVI), in dem ohne vorhergehende Alkalisierung Optochin, Chinidin und Chinin in drittel gesättigten Lösungen bei p_H 5,3 zur Vergiftung der anaeroben Gärung unter Beifügung je einer Kontrolle angewandt wurden, zeigt ein mit den bisherigen Ausführungen übereinstimmendes Resultat: Chinin hemmt kaum, Chinidin nur im geringem Maße, Optochin zu ungefähr 50 %. Der genaue Zusammenhang zwischen der Giftkonzentration und der Größe der Hemmung geht aus einigen Reihen hervor, die in den Tabellen XIV, XV, XVII und XVII

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. 108, 165, 1919; ferner diese Zeitschr. 130, 550, 1920.

wiedergegeben werden und bei denen im Gefäß folgende Alkaloidkonzentrationen wirksam waren.

Tab. 14.	Vuzin . . molar	10^{-3}	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$3,7 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$
" 15.	Chinidin . "	$2 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$
" 17.	Optochin . "	$2 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$
" 18.	" . "	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	

Die während 30 Minuten produzierten Kubikmillimeter CO_2 wurden hierbei mit der Gärung während der gleichen Zeit in einem unvergifteten Kontrollgefäß verglichen, dessen Leistung gleich 100 gesetzt und danach die Hemmung der übrigen berechnet und als Funktion der Alkaloidkonzentration eingetragen (Abb. 9 und 10). Es ist dabei nötig, den Eintritt der Vergiftung, die spätestens nach 15 Minuten eintritt, abzuwarten.

Zusammenfassung.

1. Die Abhängigkeit der Gärung von Hefe-, Zucker- und Wasserstoffionenkonzentration wird untersucht. Die Induktionszeit der Hefe wird durch kurze Vorbehandlung bei schwach alkalischer Reaktion — in Zusammenhang mit der Bildung von Glykosephosphorsäure — aufgehoben.

2. Es wird ein Verfahren angegeben, um die verschiedenen Faktoren der Vergiftung der Gärung durch die Chinaalkaloide — Abhängigkeit von der Alkaloidkonzentration, von der Dauer der Giftwirkung, von dem p_H während der Gifteinwirkung — getrennt zu untersuchen. Die Vergiftung erreicht erst nach 30 bis 60 Minuten langer Gifteinwirkung ihr Maximum.

3. Das für die Giftwirkung günstige p_H fällt mit dem Freiwerden der Alkaloidbase zusammen, wie durch Tropfenanalyse wahrscheinlich gemacht wird. Das erste Basenäquivalent wird bei Vucin und Eucupin bereits bei 4,4 bzw. 5,3 frei gemacht, und diese Alkaloide besitzen — im Gegensatz zu Chinin und Optochin — bereits bei der entsprechenden H^+ -Konzentration eine hohe Giftwirkung.

4. Der Vergleich der Giftwirkung der Glieder der Gruppe der Chinaalkaloide ist nicht durchführbar bei bloßer Innehaltung der gleichen Azidität während der Vergiftung, sondern es müssen die physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Glieder in ihrer besonderen Abhängigkeit vom p_H berücksichtigt werden.

Vorbemerkung zu den Tabellen. Die erste senkrechte Spalte enthält die Ablesungen in Minuten, die folgenden die Kubikzentimeter CO_2 , die über den Tabellen angegebenen Gift- und Zuckerkonzentrationen bezeichnen die nach dem Vermischen bestehenden Verhältnisse. So wurde z. B. in Tabelle XVI gemischt: 0,5 ccm Hefesuspension, 0,5 ccm gesättigte Giftlösung, 0,5 ccm 15%ige Glykoselösung.

Tabelle I.

Anaerobe Gärung bei gleicher Hefe-, aber verschiedener Glykosekonzentration in Kubikmillimeter CO₂. In Gefäß 26 Atmung der Hefe in Luft in Kubikmillimeter O₂.

Glykose:	3%	2%	1%	5/100	1%
Nr.:	20	21	23	24	26
0'					
5	6,5	5,8	4,9	4,5	0,275
10	19,8	13	17,0	16	0,99
16	38,5	36,5	34,5	29,5	0,66
20	51,0	50	45	39,5	1,82
25	65	65,5	58	51	1,98
31	84	83,5	76	64,75	1,98

Tabelle II.

Gärung bei verschiedenen Hefekonzentrationen in 3% Glykose.

Hefekonzentration:	1/1	1/2	1/4
Nr.:	20	24	26
0'			
5	10	5,8	7,7
10	34,5	20	19,9
15	75	34,5	29
20	102	51	39
22 1/2	0		
25	7,85	64	48
30	45,0	86	56

Tabelle III.

Gärung in verschiedenen Acetatpuffern.

p _H	4,1	4,4	4,7	5,0	5,3	5,6
Nr.:	20	21	23	24	25	26
0'						
5	15,5	7,5	7,6	7,5	19,8	7,7
10	21,5	12,5	13,5	21,5	45,5	23,7
15	26	20,5	21	44	76	45
20	28,5	29,5	30,5	68	105	61
25	30	43,5	42,75	96,5	137	80
30	31	56,5	57	12,5		97,5

Tabelle IV.

Gärung in verschiedenen Acetatpuffern.

p _H	4,7	5,0	5,3	5,6	5,9
Nr.:	21	23	24	25	26
5'	10,6	11	11	10	14,25
10	21	19,5	20	17	21,15
15	34,5	29	30,5	25	25,5
20	48	41,5	44	34,5	28
25	62	56	60,5	47	31,5

Tabelle V.

Gärung in verschiedenen Acetat- und Phosphatpuffern (20, 21, 23 = Acetat, 24, 25, 26 = Phosphat).

p_H	5,0	5,3	5,6	6,0	6,5	7,0
Nr.:	20	21	23	24	25	26
0'						
5	11,8	10,1	9,4	— 13	— 24	— 13,8
10	23	20,5	23	7	8,8	— 3,85
15	44,25	41	45	31	28,5	11
20	69,5	66	68,5	56	49,5	26
25	95,5	94	96	86,5	77	43
30	120	120	115	116	98,5	54,9

Tabelle VI.

Gärung bei $p_H = 5,3$ in 3% Glykose mit verschiedenen Chininhydrochloridkonzentrationen. In Gefäß 20 gesättigte Lösung von Chinin-HCl, in den folgenden Gefäßen $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ dieser Konzentration, 26 ohne Gift.

Nr.:	20	21	23	24	25	26
0'						
5	2,3	1,9	3	2,9	2,2	3,9
10	5	4	6	5,8	4,8	5,5
16	9,8	87	13	10	12	8,8
20	15	13,5	19	16	18	11
25	20	19	24	21	23	12,6
30	25	24	27,5	25,5	26	14
40	33	32	32,5	31,5	32,5	16
50	37	36,5	37	37	37	18
60	41,5	40,5	41	41	41,5	19,5
70	46	45	45	46	46	21
80	50	48,5	48,5	50	49	21

Tabelle VII.

Gärung mit fallender Chininkonzentration von 10^{-2} bis $3,16 \cdot 10^{-4}$ in den Gefäßen 20 bis 24. Kontrolle ohne Gift in Gefäß 25. Die Vergiftung erfolgte bei p_H 7,5 bis 8,0 während 1 Stunde.

Gift:	$3,16 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	$3,16 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	0
Nr.:	20	21	23	24	25
0'					
5	0,56	0,9	2,7	6,8	3,3
10	1,6	1,9	6,7	13	11
15	0,56	1,6	10	20	18
20	0,6	1,9	14	30	25
25	0,6	1,9	18	39	32
30	—	2,2	23	48	39
35	—	1,6	27	57	45
40	—	2,8	32	65	51
45	—	3,4	37	75	55

Tabelle VIII.

Wie vorher. 60 Minuten lange Vergiftung.

Nr.:	20	23	24	25
0'				
5	1,7	1	2,5	0,5
11	2	1	3	2
15	2,5	1	4	2
20	2,5	1,5	4,5	3,5
25	3	2,5	6	5,5
30	4	3	7	8
35	4	3,5	9	11
40	4,5	4	10	12
45	5	4,5	11,5	15
60	5	5,5	14	22,5
70	5	6	17	28,5
85	5,5	6,5	20	37
91	6	7,5	22	41,5
105	6	9	25	51
120	5	9	28,5	59,5

Tabelle IX.

Wie vorher. 30 Minuten lange Vergiftung.

Nr.:	20	21	23	24	25
0'					
5	1,4	1,9	16	11	12
10	1,1	2,15	29	30	28
15	0,5	1,9	38	38	47
20	1,1	2,5	51	55	68
25	1,1	2,5	63	70	85
30	1,4	3,1	78	88	109
35	1,7	3,75	91	106	128
40			106	0	0
40 $\frac{1}{3}$			0		
45	17	3,75	12	30	41
55	0,28	3,1	36	65	86
65	— 1,1	2,15	61	100	134
75	— 0,5	3,1	87	137	0
76					39
85	— 0,5	3,1	111	0	87
95	— 0,5	2,5	133	67	134
105				101	

Tabelle X.

Wie vorher. 1 Minute lange Vergiftung.

Nr.:	20	21	23	24	25
0'					
5	3	6	7	8	6
10	5	11	13	14	12
15	7	17	20	20	19
21	9	23	29	29	27
30	12	33	42	43	40
40	15	46	57	58	55
50	16	46	70	71	68
60	18	67	85	88	84
70	21	80	99	102	98
80	25	93	113	119	114
90	28	106		135	130
100	30				
110	31				

Tabelle XI.

$\frac{1}{250}$ mol. Chinin, verschieden lange Vergiftung der Gärung.

Vergiftungsdauer:	15'	5'	1'	10''	0'	60'
Nr.:	20	21	23	24	25	46
0'						
5	1,5	17	3	4,5	3,5	1,8
10	3,0	15	6,5	11	6	2,4
15	4	14	12	19	9	3,0
20	4	13	16,5	28	12,5	3,5
25	5	12	21	35	16	3,5
30	5	11,5	25	44	20	4,0
40	7	8	36	65	29	4,5
50	85	5	46	82	37	
60	10	2,5	55	101	46	
70	10,5	0	66	118	55	
71				0		
80	11	2,5	75	6,5	63	
90	12,5	5	85	21,5	70	
100	13,5	8	95	35,0	79	
110	14,5	10	104	50	88	
120	15	12	112	65	97	

Tabelle XII.
Wie vorher, aber $\frac{1}{1000}$ mol. Chinin.

Vergiftungsdauer:	15'	5'	1'	10''	0'	60'
Nr.:	20	21	23	24	25	46
0'						
5	4	4	3,5	5	3	2
10	9	8,5	8,5	10	9	3,5
15	15	15,5	14,5	13,5	16	
20	21	22	19,5	17,5	23,5	7,5
25	26,5	27	23,5	21	30,5	
30	33	34	29	24,5	38	12
40	49	49,5	40	34	55	15
50	65,5	65	52	43	72	18
60	82	81	62	52,5	89	23
70	97,5	97	74	63	108	26,5
72	0	0				
80	10	16	83	70,5	123	28,5
87 $\frac{1}{2}$					0	
90	26,5	52	92	80	5,5	33
100	42	39,5	102	87,5	21	37
110	56,5	52	108	96	36	
111			0			
120	71	65	8	104		
130	85	84,5	19	112	66	
140	98,5	97	28,5	120	80	

Tabelle XIII.

Vergiftung der Gärung bei p_H 5,0 mit verschiedenen Chininkörpern ohne vorherige Alkalisierung. Konzentration: 0,67 $\frac{0}{1000}$ ig, entsprechend etwa $2 \cdot 10^{-2}$ mol.

	Eucupin	Vucin	Optochin	Chinidin	H ₂ O
Nr.:	20	21	23	24	25
0'					
5	13,5	11	19,5	22,5	19
10	20	17	64	58,5	52
15	26,5	22		132	116
16			0	0	0
20	31	26,5	57,5	61	57
25	35	31	132	136	130
26			0	0	
30	38	35,5	86	68	76
35	41	40	171	162	180
36			0	0	0
40	43,5	44	64	69	88
45	45,5	47	134	144	

Tabelle XIV.

Wilde Hefe. p_H 5,3. Glykose 5%. Vucin 10^{-3} mol. in fallenden Konzentrationen.

	0	$1/1$	$1/3$	$1/9$	$1/27$	$1/81$
Nr.:	20	21	23	24	25	46
0'						
10	17	17	20	22	19	18
20	34	24	32	36	33	34
30	52	29	33	51	48	49
40	67	33	52	66	63	64
50	85	37	61	82	80	82
60	100	40	70	97	96	97
70	116	45	80	112	114	113
80	131	48	87	112	128	129
90	146	52	96	9	143	142
92	0				0	0
100	12	56	105	24	15	16
110	27	59	112	39	30	31
120	41	62	120	52	45	45
130	57	65	128	68	61	61
140	70	68	134	80	74	74
142			0			
150	85	72	8,5	94	89	89
160				107	102	101

Tabelle XV.

Wilde Hefe. p_H 5,3. 5% Glykose. Chinidin $2 \cdot 10^{-2}$ mol. in fallenden Konzentrationen.

	0	$1/1$	$1/2$	$1/4$	$1/8$	$1/16$
Nr.:	20	21	23	24	25	46
0						
10	16	13	16	15	14	14
20	29	25	29	26	25	25
30	44	36	42	41	37	38
40	58	46	53	54	49	51
50	72	54	63	65	61	64
60	85	62	73	77	73	76
70	100	69	82	89	88	90
80						
81	114	75	90	101	99	103
90	126	81	97	112	112	115
100	138	86	106	122	124	127
101				0	0	
110	151	91	111	8	10	189
120	0	96	117	19	22	11
131	23	100	123	43	35	23
132			0			
140	34	102	5	39	45	34
150	45	104	12	47	55	45
160	56	106	17	55	64	54
170	67	107	22	62	73	63
180	76	104	28	69	83	73
190	86	110	34	77	91	82

Tabelle XVI.

Wilde Hefe. $p_H = 5,3$. 5% Glykose. $\frac{1}{3}$ -gesättigte Lösungen.

	Optochin	H ₂ O	Chinidin	H ₂ O	Chinin	H ₂ O
Nr.:	20	21	23	24	25	26
0'						
5	13	12,5	14	12	13	12
10	23,5	23,5	25,5	23	22,5	24
15	32,5	34	36	34	33	34
20	39,5	38,5	39,5	46	43,5	45
25	46	55	54	56	52,5	55
30	51	65	63	67	62,5	66
40	55,5	85	73	88	82	86
50	58,5	105	84	108	100	107

Tabelle XVII.

Wilde Hefe. p_H 5,3. 5% Glykose. Optochin $2 \cdot 10^{-2}$ mol. in fallenden Konzentrationen.

Giftkonz.:	0	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$
Nr.:	20	21	23	24	25	46
0'						
5	9	7	11,5	13	11	10,5
10	19	19	22	22,5	19	18,5
15	29	28	31	31	27	26,5
20	38	36	39,5	39	33	34
25	48	44	48,5	46,5	40	40
30	58	53	58	55,5	47	47
40	75	68	73	69	59	56,5
50	94	83	88	84	70	67,5
60	111	98	103	97	80	77
70	128	112	117	110	88	84
80	13	124	130	120	96	88,5
81		0	0,7			
90	27,5	10,5	9,5	130	100	94
100	44	24	25,5	142	110	100
110	59,5	38	39	153	116	100
120	76,5	52	46	162	122	110
130	88	63,5	65	172	126	113
140	106	77	79	0	134	119
150	116	89	90	9	138	121
160	131	102	103	174	144	126

Tabelle XVIII.

Wilde Hefe. $p_H = 5,3$. 5% Glykose. Optochin 10^{-2} mol. in fallenden Konzentrationen.

Nr.:	0	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{1}$
	20	21	23	24	25
0'					
10	16	13	8	4	2
20	35	24	16	9	3,5
30	54	35	24	12	4,5
50	87	53	34	16	5,5
60	104	61	38	19	7,5
70	122	70	45	22	10
71	0				
80	15	78	49	25	11
90	31	85	52	26	11,5
100	46	91	55	27	12
110	61	97	57	28	13
120	76	103	59	29	13

**Die Verteilung der Milchsäure
zwischen Wasser und Äther sowie Wasser und Amylalkohol.
Bemerkung zu der gleichbetiteltten Arbeit von R. Dietzel und E. Rosenbaum¹.**

Von
W. U. Behrens.

(Mitteilung aus der Sächsischen Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt
Leipzig-Möckern.)

(Eingegangen am 13. August 1927.)

Kürzlich veröffentlichten *R. Dietzel* und *E. Rosenbaum* Messungen über die Verteilung der Milchsäure zwischen Wasser und Äther sowie Wasser und Amylalkohol. Die Verfasser bemängeln, daß in den von *J. Pinnow*, *E. Ohlson*, *G. Riesenfels*, *R. Ege* und mir ausgeführten Untersuchungen zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten die elektrolytische Dissoziation der Milchsäure unberücksichtigt geblieben sei, und berechnen selbst den Verteilungskoeffizienten unter Berücksichtigung der elektrolytischen Dissoziation der Milchsäure in Wasser. Sollen aus den Verteilungsmessungen Schlüsse auf den Molekularzustand der Säure in verschiedenen Medien gezogen werden, so ist es natürlich notwendig, die elektrolytische Dissoziation der Säure in Wasser zu berücksichtigen und zur Berechnung des Verteilungskoeffizienten die Konzentration der undissoziierten Säure zugrunde zu legen. Dienen die Verteilungsmessungen vor allem als Hilfsmittel für analytische Untersuchungen wie in der Arbeit von *R. Dietzel* und *E. Rosenbaum* und in meiner Arbeit², so ist es nach meiner Ansicht im allgemeinen nicht rationell, bei Aufstellung einer Beziehung zwischen der Konzentration und dem Verteilungskoeffizienten den letzteren stets auf die undissoziierte Säure umzurechnen, weil bei jeder praktischen

¹ Diese Zeitschr. 185, 275, 1927.

² Zeitschr. f. analyt. Chem. 69, 97, 1926, vgl. insbesondere S. 106 die Unterscheidung zwischen der empirischen Interpolationsformel I ohne Berücksichtigung der elektrolytischen Dissoziation und der Interpolationsformel II zur Berechnung des Assoziationsgrades im Äther mit Berücksichtigung der elektrolytischen Dissoziation.

Anwendung dann dieselbe Umrechnung vorgenommen werden muß. Es empfiehlt sich vielmehr, eine Beziehung zwischen den Gesamtkonzentrationen in beiden Lösungsmitteln zu ermitteln und für analytische Zwecke zu benutzen.

Ich habe nun die sich aus den Messungen von *R. Dietzel* und *E. Rosenbaum* ergebenden Werte für den Verteilungskoeffizienten nachgerechnet und gelange dabei zu anderen Zahlen als die Beobachter. Bezeichnet man die Konzentration an Gesamtmilchsäure in Wasser mit c'_w , die Konzentration der undissoziierten Säure mit c_w und den Dissoziationsgrad mit α , so läßt sich c_w nach folgender Formel finden:

$$c_w = c'_w (1 - \alpha).$$

R. Dietzel und *E. Rosenbaum* haben jedoch c_w offenbar mit Hilfe der unrichtigen Gleichung $c_w = c'_w - \alpha$ berechnet. Vor allem im Bereich niedriger Konzentrationen sind die in der Arbeit angegebenen Werte fehlerhaft. Beträgt z. B. c'_w 0,2010 (Tabelle II viertletzte Zeile), so ist $c_w = 0,1956$ statt 0,1749, $c_w/c_a = 9,73$ statt 8,70, während ohne die Korrektur sich $c'_w/c_a = 10,00$ ergibt. Die unter Berücksichtigung der elektrolytischen Dissoziation berechneten Verteilungskoeffizienten weichen von den direkt errechneten viel weniger ab, als es nach den Tabellen von *R. Dietzel* und *E. Rosenbaum* scheinen könnte, ein Grund mehr, sich bei analytischer Verwertung der Zahlen die Umrechnung zu ersparen.

Über den Stoffwechsel der Hefe.

Von

Otto Warburg (Berlin-Dahlem).

(Eingegangen am 5. September 1927.)

Mißt man den Stoffwechsel käuflicher Bäckerhefen bei 20° in Bierwürze, so findet man Werte wie die folgenden¹:

Bäckerhefe der Fabrik Haak, Guben:

$$Q_{O_2} = -96 \quad Q_G^{N_2} = +192 \quad \frac{Q_{O_2}}{Q_G^{N_2}} = 0,5$$

Bäckerhefe aus dem Fabrikbetrieb des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe:

$$Q_{O_2} = -78 \quad Q_G^{N_2} = +227 \quad \frac{Q_{O_2}}{Q_G^{N_2}} = 0,34$$

Mißt man unter den gleichen Bedingungen im Laboratorium gezüchtete Reinkulturen von Heferassen, von denen die Technik bei der Erzeugung der Bäckerhefe ausgeht, so findet man beispielsweise:

Rasse 12 des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe:

$$Q_{O_2} = -11 \quad Q_G^{N_2} = +240 \quad \frac{Q_{O_2}}{Q_G^{N_2}} = 0,04 \%$$

Die im Fabrikbetrieb gezüchteten Bäckerhefen atmen also acht- bis zehnmal so stark, wie die im Laboratorium gezüchtete Reinkultur. Dies spricht dafür, daß die große Atmung der käuflichen Bäckerhefen keine integrierende Eigenschaft bestimmter Heferassen ist, sondern eine

¹ Q_{O_2} = Atmung, $Q_G^{N_2}$ = anaerobe Gärung, beide in Kubikmillimet. (O_2 oder CO_2) pro Stunde und Milligramm Trockensubstanz.

Eigenschaft, die bei der Fabrikation der Hefe entsteht und unter anderen Wachstumsbedingungen wieder verschwindet. Ich habe mich mit der Frage beschäftigt, welche Maßnahmen der Fabrikation die große Atmung erzeugen.

Es gibt zwei Verfahren der Bäckerhefefabrikation, das alte „Wiener“ Verfahren und das neue „Lüftungsverfahren“. Bei beiden Verfahren läßt man die Hefe zunächst in zuckerhaltigen Flüssigkeiten unter mäßiger Lüftung wachsen. Charakteristisch für das neue Verfahren ist die Fortsetzung und Steigerung der Lüftung zu einer Zeit, zu der die Hefe den Zucker der Nährlösung schon wesentlich verbraucht hat. Dann wächst die Hefe vorwiegend auf Kosten der Atmung (Alkoholverbrennung?). Der technische Vorteil des neuen Verfahrens ist offenbar der, daß man pro Gramm verbrauchten Zuckers mehr Hefe erntet als bei dem alten Verfahren.

Die oben angeführten käuflichen Bäckerhefen stammen von Betrieben, die nach dem neuen Verfahren arbeiten. Nach dem alten Verfahren arbeiten in Deutschland nur noch zwei Fabriken. Ich habe die Bäckerhefe einer dieser Fabriken (Christiansen in Flensburg) untersucht und folgende Stoffwechselgrößen gefunden (Bierwürze, 20°):

$$Q_{O_2} = -20 \quad Q_G^{N_2} = +246 \quad \frac{Q_{O_2}}{Q_G^{N_2}} = 0,08.$$

Wie man sieht, ist die Atmung dieser Bäckerhefe viel kleiner als die Atmung der nach dem Lüftungsverfahren gewonnenen Hefe ($\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{5}$). Handelt es sich hier nicht um Unterschiede der Rassen, sondern um Unterschiede in der Fabrikation, so muß es möglich sein, ausgehend von einer Reinkultur, Hefen mit großer oder kleiner Atmung zu züchten, je nachdem man das neue oder das alte Verfahren der Technik nachahmt.

Ich impfte Bierwürze mit einer Öse der Heferasse 12, durchlüftete bei 30° und entnahm zwei Hefeproben zu verschiedenen Zeiten: die erste, als noch die Hauptmenge des Zuckers in der Würze vorhanden war, die zweite 3 Tage nach Verbrauch des Zuckers. Die Stoffwechselgrößen waren (Bierwürze, 20°):

Rasse 12 aus zuckerhaltiger Würze (Alter der Kultur 8 Stunden):

$$Q_{O_2} = -11 \quad Q_G^{N_2} = +240 \quad \frac{Q_{O_2}}{Q_G^{N_2}} = 0,04.$$

Rasse 12 aus zuckerfreier Würze (3 Tage nach Verbrauch des Zuckers weiter durchlüftet):

$$Q_{O_2} = -49 \quad Q_G^{N_2} = +174 \quad \frac{Q_{O_2}}{Q_G^{N_2}} = 0,28.$$

Die Atmung der Rasse 12 stieg also bei der Durchlüftung in zuckerfreier Lösung auf das Vierfache, das Verhältnis Atmung/Gärung auf das Siebenfache.

Aus den angeführten Beobachtungen ist zu schließen, daß die große Atmung der käuflichen Bäckerhefe eine Eigenschaft ist, die bei der Fabrikation entsteht, wenn man die Hefe zwingt, auf Kosten der Atmung zu wachsen. Vielleicht kommt in der Technik, die nicht mit Reinkulturen arbeitet, hinzu, daß bei der Lüftung in zuckerarmer Lösung die stark atmenden wilden Hefen sich anreichern, die die Bäckerhefen des Handels immer in wechselnder Menge verunreinigen.

Methode.

Der Stoffwechsel wurde manometrisch in zwei kegelförmigen¹ Gefäßen gemessen, von denen das erste zur Atmungsmessung und das zweite zur Gärungsmessung diente. Bei der sauren Reaktion der Bierwürze (p_H etwa 5,6) war die kompliziertere Anordnung, wie sie für Versuche mit tierischen Zellen notwendig ist, überflüssig. Im einzelnen war die Anordnung folgende:

	Gefäß I	Gefäß II
Einsatz	0,3 ccm 5% KOH	leer
Birne	0,3 ccm 5% KOH	leer
Hauptraum . . . {	2 ccm Bierwürze	2 ccm Bierwürze
	0,005 ccm Zellen	0,002 ccm Zellen
Gasraum	Luft	Stickstoff, über Kupfer geglüht
Temperatur . . .	20°	20°

Die Versuchszeit betrug 10 bis 20 Minuten und war so kurz, daß die Vermehrung der Hefe während der Messung nicht in Betracht kam. Auch aus anderen Gründen sollten bei derartigen Versuchen die Meßzeiten so kurz wie möglich sein. Denn es ist klar, daß Unterschiede im Stoffwechsel, die durch verschiedene Züchtungsbedingungen erzeugt worden sind, durch zu lange Meßzeiten wieder verwischt werden können.

Ich habe früher² bei manometrischen Messungen des Hefestoffwechsels nicht Bierwürze, sondern glucosehaltige Phosphatlösung benutzt, ein Milieu, in dem die Hefe kaum wächst, und das im

¹ Abbildung diese Zeitschr. 177, 471, 1926.

² H. S. 81, 99, 1912.

allgemeinen der Bierwürze vorzuziehen ist. Für die Untersuchung der Lebensbedingungen der Hefe aber — der Stoffwechseleigenschaften der Rassen und des Stoffwechsels beim Wachstum — sind einfach zusammengesetzte Lösungen, wie Glucose-Phosphat, ungeeignet. Denn der Stoffwechsel vieler Heferassen ändert sich beim Übergang von dem natürlichen Milieu zu einfachen Lösungen sehr erheblich.

Herrn Dr. *Glaubitz* vom Berliner Institut für Gärungsgewerbe möchte ich auch hier danken für die Überlassung von Stämmen reiner Hefen sowie vielfache Belehrung über Züchtung von Hefen.

Über die Wirkung von Kohlenoxyd und Stickoxyd auf Atmung und Gärung.

Von

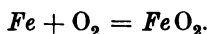
Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 5. September 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Im ersten Teile dieser Arbeit wird gezeigt, daß die Primärreaktion der Atmung eine Reaktion zwischen einem Atom Eisen und einem Molekül Sauerstoff ist



Im zweiten Teile wird versucht, die Theorie der Atmung auf das Gärungsproblem anzuwenden. Das Ergebnis ist, daß Atmung und Gärung ihrem chemischen Mechanismus nach verwandte Vorgänge sind. Das Gärungsferment reagiert zwar nicht, wie das Atmungsferment, mit Kohlenoxyd, selbst nicht bei einem Kohlenoxyddruck von 60 Atmosphären, aber es bildet mit Stickoxyd eine dissoziierende Verbindung

1. Theorie der Verteilung.

Bezeichnen wir das Atmungsferment mit Fe , so sind unsere Ausgangsgleichungen



Ist die Atmung klein, so ist

$$-\frac{dFeO_2}{dt} = Z \cdot FeO_2 - B \cdot Fe \cdot O_2, \quad (3)$$

$$-\frac{dFeCO}{dt} = z \cdot FeCO - b \cdot Fe \cdot CO, \quad (4)$$

wo Z und z die Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls und B und b die Geschwindigkeitskonstanten der Bildung bezeichnen. FeO_2 , $FeCO$, Fe , O_2 und CO sind auf das gleiche Volumen zu beziehen.

Im Gleichgewicht sind die Differentialquotienten nach der Zeit Null, also

$$\frac{FeO_2}{Fe \cdot O_2} = \frac{B}{Z} = k_{O_2}, \quad (5)$$

$$\frac{FeCO}{Fe \cdot CO} = \frac{b}{z} = k_{CO}. \quad (6)$$

k_{O_2} ist die Affinitätskonstante der Reaktion (1), k_{CO} die Affinitätskonstante der Reaktion (2).

Dividieren wir (5) durch (6), so erhalten wir die Verteilungsgleichung

$$\frac{FeO_2 \cdot CO}{FeCO \cdot O_2} = \frac{B}{Z} \cdot \frac{z}{b} = \frac{k_{O_2}}{k_{CO}} = K, \quad (7)$$

in der also K das Verhältnis der Affinitäten des Atmungsferments zu Sauerstoff und Kohlenoxyd ist.

Störung durch die Atmung. Ist die Atmung nicht Null, so wird FeO_2 nicht nur durch Dissoziation zu Fe und O_2 verbraucht, sondern auch durch die Atmung. Dann kommt in Gleichung (3) ein Glied $Z' FeO_2$ hinzu

$$-\frac{dFeO_2}{dt} = Z \cdot FeO_2 + Z' \cdot FeO_2 - B \cdot Fe \cdot O_2,$$

während Gleichung (4) unverändert bleibt,

$$-\frac{dFeCO}{dt} = z \cdot FeCO - b \cdot Fe \cdot CO.$$

Im stationären Zustande sind die Differentialquotienten nach der Zeit Null, also

$$\frac{FeO_2}{Fe \cdot O_2} = \frac{B}{Z + Z'} = k'_{O_2}, \quad (5a)$$

$$\frac{FeCO}{Fe \cdot CO} = \frac{b}{z} = k_{CO} \quad (6)$$

und nach Division von (5a) durch (6)

$$\frac{FeO_2 \cdot CO}{FeCO \cdot O_2} = \frac{B}{Z + Z'} \cdot \frac{z}{b} = \frac{k'_{O_2}}{k_{CO}} = k. \quad (8)$$

Die Atmung stört also das Gleichgewicht. k'_{O_2} ist kleiner als k_{O_2} und folglich auch k kleiner als K . k ist nicht das Verhältnis der Affinitäten k_{O_2}/k_{CO} , sondern gibt nur den Minimalwert für dies Verhältnis an,

$$\frac{k_{O_2}}{k_{CO}} > k. \quad (8a)$$

Störung durch Belichtung. Bei Belichtung ändert sich die Verteilung des Atmungsferments zwischen Sauerstoff und Kohlenoxyd. Beruht dies auf einem photochemischen Zerfall der Kohlenoxydverbindung des Atmungsferments, so wird $FeCO$ nicht nur durch spontane Dissoziation zu Fe und CO verbraucht, sondern auch durch photochemische Dissoziation, und es kommt in Gleichung (4) ein Glied hinzu, das der photochemischen Dissoziation Rechnung trägt.

Bei der Ableitung der Gleichungen machen wir zur Bedingung, daß das Licht beim Durchgang durch die Versuchsobjekte praktisch nicht geschwächt wird, eine Bedingung, die wegen der schwachen Absorption der Zellen experimentell leicht zu erfüllen ist. Dann ist die Lichtmenge, die von der Kohlenoxydverbindung des Atmungsferments in der Zeiteinheit absorbiert wird,

$$-di = \alpha \cdot i \cdot FeCO, \quad (9)$$

wo i die in der Zeiteinheit in das Objekt eingestrahlte Energie bedeutet und α den Absorptionskoeffizienten des $FeCO$. Die in der Zeiteinheit photochemisch zerfallende $FeCO$ -Menge setzen wir der Zahl der von $FeCO$ absorbierten Quanten proportional und erhalten dann¹ statt (4)

$$-\frac{dFeCO}{dt} = z \cdot FeCO + \frac{z' \alpha i}{h\nu} \cdot FeCO - b \cdot Fe \cdot CO \quad (4a)$$

Im stationären Zustand ist der Differentialquotient nach der Zeit Null, also

$$\frac{FeCO}{Fe \cdot CO} = \frac{b}{z + z' \frac{\alpha i}{h\nu}} = k'_{CO} \quad (6a)$$

An Stelle von (6) tritt so (6a), während Gleichung (5a) unverändert bleibt,

$$\frac{FeO_2}{Fe \cdot O_2} = \frac{B}{Z + Z'} = k'_{O_2}. \quad (5a)$$

Dividieren wir (5a) durch (6a), so erhalten wir die Verteilungsgleichung

$$\frac{FeO_2}{FeCO} \cdot \frac{CO}{O_2} = \frac{B}{Z + Z'} \cdot \frac{z + z' \frac{\alpha i}{h\nu}}{b} = k_{hell}, \quad (9)$$

die für $i = 0$ übergeht in

$$\frac{FeO_2}{FeCO} \cdot \frac{CO}{O_2} = \frac{B}{Z + Z'} \cdot \frac{z}{b} = k_{dunkel}. \quad (8)$$

¹ $h\nu$ = Energie des Lichtquantums für Licht der Frequenz ν .

Ein Vergleich von (9) und (8) lehrt, daß die Konstante der Verteilungsgleichung bei Bestrahlung größer wird, und zwar ist k_{hell}

$$\frac{z + z' \frac{\alpha i}{h\nu}}{z} \text{ mal}$$

größer als k_{dunkel} .

Experimentell von Bedeutung ist die Größe

$$\Delta k = k_{\text{hell}} - k_{\text{dunkel}},$$

nach (8) und (9)

$$\Delta k = \frac{B}{Z + Z'} \cdot \frac{z' \frac{\alpha i}{h\nu}}{b}. \quad (10)$$

Aus (10) folgt für konstantes ν

$$\frac{\Delta k_1}{\Delta k_2} = \frac{i_1}{i_2} \quad (11)$$

und für konstantes i

$$\frac{\Delta k_1}{\Delta k_2} = \frac{\alpha_1}{\alpha_2} \cdot \frac{\nu_2}{\nu_1}, \quad (12)$$

zwei einfache Beziehungen, von denen sich (11) zur Prüfung der Theorie eignet, (12) zur Bestimmung der Lichtabsorptionskurve des FeCO .

2. Berechnung des Quotienten FeO_2/FeCO aus der Atmungshemmung.

Da die normale Atmung bis herab zu sehr niedrigen Sauerstoffdrücken unabhängig vom Sauerstoffdruck ist, so verläuft die Bildung des FeO_2 schnell gegen den Verbrauch an FeO_2 , und im stationären Zustande liegt fast das gesamte Ferment als FeO_2 vor. In Kohlenoxyd kommt FeCO hinzu, so daß wir zwei Formen des Atmungsferments haben, FeO_2 und FeCO . Die reduzierte Form Fe ist in Kohlenoxyd a fortiori zu vernachlässigen, da die Atmung in Kohlenoxyd kleiner ist.

Sinkt in Kohlenoxyd die Atmung von A_0 auf A , so wollen wir

$$\frac{A}{A_0} = n \quad (13)$$

als den *Atmungsrest* und

$$\frac{A_0 - A}{A_0} = 1 - n \quad (14)$$

als die *Atmungshemmung* bezeichnen.

Nehmen wir an, daß der Atmungsrest zur Atmungshemmung im Verhältnis der beiden Formen des Atmungsferments steht, so haben wir

$$\frac{FeO_2}{FeCO} = \frac{n}{1-n}, \quad (15)$$

und die Verteilungsgleichung

$$\frac{FeO_2}{FeCO} \cdot \frac{CO}{O_2} = k$$

erhält die Form

$$\frac{n}{1-n} \cdot \frac{CO}{O_2} = k. \quad (16)$$

Hier sind alle Größen der linken Seite experimentell bestimmbar, n durch Atmungsmessung, CO und O_2 durch Gasanalyse.

Verallgemeinerung. Die Atmung erreicht in der Regel bei kleinen Konzentrationen an verbrennlicher Substanz ein Maximum, das durch Zusatz von verbrennlicher Substanz nicht überschritten werden kann. Dann sind die Oberflächen in der Zelle mit verbrennlicher Substanz gesättigt. Offenbar ist der Ansatz (15) nur für „gesättigte“ Zellen gültig. In ungesättigten Zellen liegt ein Teil des Atmungsferments brach, und bindet man diesen Teil an Kohlenoxyd, so wird die Atmung nicht gehemmt.

Unter Sättigungsgrad verstehe ich den Bruchteil ε der maximalen Atmung für eine bestimmte Substanz. Ist beispielsweise die Hefe-atmung bei der niedrigen Zuckerkonzentration c gleich 1 und steigt sie bei Zuckerzusatz maximal bis auf 15, so ist bei der Zuckerkonzentration c der Sättigungsgrad $\varepsilon = 1/15$. Dann sind die speziellen Gleichungen (15) und (16) durch die allgemeineren Gleichungen

$$\frac{FeO_2}{FeCO} = \frac{\varepsilon n}{1-\varepsilon n} \quad (15a)$$

$$\frac{\varepsilon n}{1-\varepsilon n} \cdot \frac{CO}{O_2} = k \quad (16a)$$

zu ersetzen, in denen also n der Atmungsrest von Zellen ist, deren Sättigungsgrad ε beträgt. Für $\varepsilon = 1$ gehen die allgemeinen Gleichungen wieder in die speziellen über.

3. k_L und k_G .

In der Gleichung

$$\frac{FeO_2}{FeCO} \cdot \frac{CO}{O_2} = k$$

heben sich die Dimensionen der Größen heraus, so daß es gleichgültig ist, welche Einheiten man wählt und ob man CO und O_2 in Drucken oder Vol.-Prozenten ausdrückt.

Doch ist es nicht gleichgültig, ob man unter CO/O_2 das Verhältnis der Gase im Gasraum oder in der Lösung versteht, wegen der verschiedenen Löslichkeit des Kohlenoxyds und Sauerstoffs. Es ist, wenn α_{CO} und α_{O_2} die Absorptionskoeffizienten für Kohlenoxyd und Sauerstoff bedeuten,

$$\left(\frac{\text{CO}}{\text{O}_2}\right)_{\text{Lösung}} = \left(\frac{\text{CO}}{\text{O}_2}\right)_{\text{Gasraum}} \cdot \frac{\alpha_{\text{CO}}}{\alpha_{\text{O}_2}}$$

und für 20°

$$\left(\frac{\text{CO}}{\text{O}_2}\right)_{\text{Lösung}} = \left(\frac{\text{CO}}{\text{O}_2}\right)_{\text{Gasraum}} \cdot 0,75.$$

Je nachdem man also unter CO/O_2 das Verhältnis der Gase im Gasraum oder in der Lösung versteht, erhält man verschiedene Zahlenwerte für k . Wir unterscheiden sie als k_L und k_G . Für 20° ist

$$k_L = 0,75 \cdot k_G.$$

Wir benutzen im allgemeinen k_G , weil die Analyse $(\text{CO}/\text{O}_2)_{\text{Gasraum}}$ liefert und $\alpha_{\text{CO}}/\alpha_{\text{O}_2}$ für die Zellflüssigkeit nicht sicher bekannt ist. Die physikalische Bedeutung von k_G ergibt sich, wenn wir in der Gleichung

$$\frac{n}{1-n} \cdot \frac{\text{CO}}{\text{O}_2} = k_G$$

$n = 0,5$ setzen. Dann wird $\frac{n}{1-n} = 1$. k_G ist also dasjenige Verhältnis der Gase im Gasraum, das eine Atmungshemmung von 50% bewirkt.

4. Einige Eigenschaften der Verteilungsgleichung.

Die Gleichung

$$\frac{n}{1-n} \cdot \frac{\text{CO}}{\text{O}_2} = k \quad (16)$$

nach n aufgelöst, ergibt

$$n = \frac{k \frac{\text{O}_2}{\text{CO}}}{1 + k \frac{\text{O}_2}{\text{CO}}}, \quad (17)$$

und nach $1-n$ aufgelöst

$$1-n = \frac{\frac{\text{CO}}{\text{O}_2}}{\frac{\text{CO}}{\text{O}_2} + k}. \quad (18)$$

Die Wirkung des Kohlenoxyds auf die Atmung ist also bestimmt durch das Verhältnis CO/O_2 und eine Konstante. Verdünnen wir ein Kohlenoxyd-Sauerstoffgemisch beliebig mit einem indifferenten Gas,

z. B. Wasserstoff oder Stickstoff, so ändert sich die Wirkung auf die Atmung nicht¹.

Ist $\text{CO}/\text{O}_2 = k$, so wird $1 - n = 0,5$, die Atmungshemmung also 50 %. Ist CO/O_2 groß gegen k , so wird $1 - n = 1$, die Atmungshemmung also vollständig.

In Abb. 1 ist die Atmungshemmung $1 - n$ als Funktion von CO/O_2 aufgetragen, und zwar für drei verschiedene Werte von k . Wie man sieht, ist die Atmungshemmung für einen gegebenen Wert von CO/O_2 um so größer, je kleiner k ist. Ein kleines k bedeutet also eine hohe Empfindlichkeit der Atmung gegen Kohlenoxyd und umgekehrt.

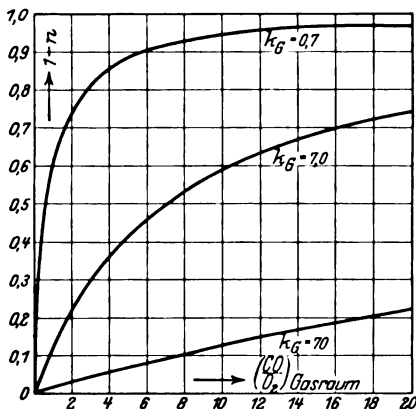


Abb. 1.

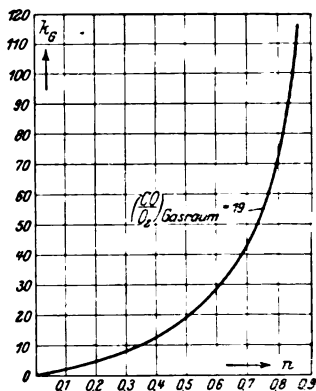


Abb. 2.

In Abb. 2 ist k als Funktion von n für $\text{CO}/\text{O}_2 = 19$ aufgetragen. Die Funktion ist für photochemische Versuche wichtig, bei denen man CO/O_2 konstant hält, Δn mißt und Δk aus Δn berechnet. dk/dn wächst sehr stark mit n .

5. Affinitäten des Atmungsferments.

Ist die Atmung Null, so ist k_L , der Verteilungsgleichung das Verhältnis der Affinitäten des Sauerstoffs und des Kohlenoxyds zu dem Atmungsferment. Ist die Atmung nicht Null, so ist k_L der Minimalwert dieses Verhältnisses. Doch gibt k_L keine Auskunft über den absoluten Wert der Affinitäten.

Da die absoluten Werte von fundamentaler Bedeutung sind, so ist folgende Rechnung von Interesse:

Die Atmung der Hefe ändert sich nicht merklich², wenn wir mit dem Sauerstoffdruck von einer Atmosphäre auf 0,02 Atmosphären

¹ Falls der Sauerstoffdruck nicht so niedrig wird, daß in den Zellen Sauerstoffmangel entsteht.

² Vgl. Abschnitt 12.

heruntergehen. Rechnen wir mit einem Fehler von 2 % bei der Atmungsmessung, so ist, wenn wir mit n den Atmungsrest und mit p_{O_2} den Sauerstoffdruck bezeichnen,

$$\frac{FeO_2}{Fe \cdot p_{O_2}} = k_{O_2}, \quad (19)$$

$$\frac{n}{(1-n) \cdot p_{O_2}} = k_{O_2}.$$

Für $n = 0,98$ und $p_{O_2} = 0,02$ Atmosphären

$$\frac{0,98}{(1-0,98) \cdot 0,02} = 2500.$$

Messen wir also den Sauerstoffdruck in Atmosphären, so ist 2500 der Minimalwert der Affinität des Sauerstoffs zu dem Atmungsferment. Bei einem Sauerstoffdruck von $1/2500$ Atmosphären ist die Sauerstoffverbindung des Atmungsferments höchstens zur Hälfte dissoziiert. $k_{O_2} \geq 2500$.

Da $k \leq k_{O_2}/k_{CO}$ ist, so können wir auch für k_{CO} eine Grenze angeben. Setzen wir $k = 9$ (vgl. Abschnitt 8), so wird $k_{CO} \geq 280$. Bei einem Kohlenoxyddruck von $1/280$ Atmosphären ist die Kohlenoxydverbindung des Atmungsferments höchstens zur Hälfte dissoziiert.

Anmerkungen zu 1 bis 5.

Obwohl die Atmung eine Reaktion an Oberflächen ist, setzen wir die Reaktionsgeschwindigkeiten proportional den vorhandenen Massen an Ferment. Wir lassen also sämtliche Fermentmoleküle gleichartig reagieren und unterscheiden nicht unlösliches, nichtreagierendes von löslichem, reagierendem Ferment. Dann ist es gleichgültig, ob die Fermentmoleküle freibeweglich in Lösung oder fest in die Oberflächen eingelagert sind.

k_L der Verteilungsgleichung enthält einen Faktor x , der von der Adsorption des Kohlenoxyds und Sauerstoffs an den Oberflächen herrührt. Denn es ist

$$\left(\frac{CO}{O_2}\right)_{\text{Lösung}} = x \cdot \left(\frac{CO}{O_2}\right)_{\text{Oberfläche}}.$$

Aus der Konstanz von k folgt, daß x unabhängig von CO/O_2 ist, daß also hier die *Freundlichsche* Adsorptionsisotherme nicht gilt.

Löst man das Atmungsferment von den Oberflächen ab, so wird sich x und damit k ändern. Die Atmung intakter Zellen und die Atmung von Zellextrakten wird also verschieden empfindlich gegen Kohlenoxyd sein.

6. Hefe in Glucose-Phosphat.

In Phosphatlösung, die 1 % Glucose enthält, sind Hefezellen mit Glucose gesättigt ($\varepsilon = 1$). In diesem Falle ist die einfache Formel

$$\frac{n}{1-n} \cdot \frac{CO}{O_2} = k \quad (16)$$

anzuwenden.

Tabelle I.

Bäckerhefe in m/20 KH_2PO_4 , m/18 Glucose. Dunkel.

Nr.	Temperatur °C	Gasmischung in Vol.-%		Hemmung der Atmung in %	k_G
		CO	O ₂		
1	20	80,1	19,9	35	7,5 (a)
		88,6	11,4	61 ber. 51	5,0 (b)
2	37,5	80,7	19,3	38	6,8 (a)
		87,7	12,3	60 ber. 51	4,8 (b)
3	37,5	78	22	22	18 (a)
		90,6	9,4	55 ber. 43	8 (b)
4	20	78,8	21,2	24	12 (a)
		79,0	4,4	72 ber. 60	7 (b)
5	37,5	76,8	23,2	34	6,5 (a)
		74,7	5,3	77 ber. 69	4,8 (b)
6	37,5	80	20	36	7,2 (a)
		80	4,4	74 ber. 72	6,4 (b)

Tabelle I enthält das Ergebnis von sechs Versuchen nach Daten der ersten Arbeit¹. Jeder Versuch besteht aus einem Paar von Messungen, a und b, bei zwei verschiedenen Werten von CO/O₂. In dem b-Versuch ist CO/O₂ immer größer und auch, in Übereinstimmung mit der Theorie, die Atmungshemmung. Doch sieht man aus der letzten Spalte der Tabelle, daß k nicht konstant ist, sondern kleiner wird, wenn die Atmungshemmung zunimmt. Ich habe aus dem k des a-Versuchs die Hemmung für den b-Versuch nach Gleichung (16) berechnet und in Kleindruck den experimentell gefundenen Hemmungen beigelegt. Der Abfall der k -Werte bedeutet, daß die gefundene Atmungshemmung rund 10 % zu groß ist. Die Abweichung von der Theorie ist systematisch und außerhalb der Fehlergrenzen der Messungen.

Immerhin sind die Abweichungen nicht sehr groß. Man hat den Eindruck, daß die Theorie im Prinzip stimmt und daß die Abweichungen von irgendwelchen Störungen herrühren. In erster Linie war dabei an die Gärung zu denken, die zunimmt, wenn die Atmung abnimmt. Zellen, die verschieden stark gären, sind nicht unter gleichen inneren Bedingungen, die bei der Ableitung der Gleichungen vorausgesetzt wurden.

Um Störungen durch die Gärung zu vermeiden, habe ich den Zucker der Phosphatlösung durch andere verbrennliche Substanzen, wie Äthylalkohol oder Essigsäure ersetzt, ohne im übrigen die Versuchsanordnung wesentlich zu ändern.

¹ O. Warburg, diese Zeitschr. 177, 471, 1926; der dort beschriebenen Versuchsanordnung habe ich nichts hinzuzufügen.

7. Hefe in Alkoholphosphat.

In Phosphatlösung, die 1 % Äthylalkohol oder 0,06 % Essigsäure enthält, sind Hefezellen gesättigt ($\varepsilon = 1$). Auch in diesem Falle ist also die einfache Formel

$$\frac{n}{1-n} \cdot \frac{\text{CO}}{\text{O}_2} = k \quad (16)$$

anzuwenden.

Die Hefesuspensionen wurden in alkohol- oder essigsäurehaltiger Phosphatlösung einige Stunden vor Beginn der Hemmungsversuche mit Luft geschüttelt, um das Maximum der Atmung zu haben, das nicht immer sofort bei Zusatz der verbrennlichen Substanz da ist. Tabelle II enthält ein Versuchsbeispiel mit allen experimentellen Einzelheiten, Tabelle III das Ergebnis von fünf Versuchen. Die k -Werte der a- und b-Versuche stimmen so gut überein, als dies bei der Genauigkeit der Messungen möglich ist. Am schlechtesten stimmen sie in Versuch 1. Berechnen wir für diesen Versuch aus a die Atmungs- hemmung für b, so ergibt sich 63 gegen 66 %, eine Differenz, die in den Grenzen der Meßfehler liegt.

Das Ergebnis ist, daß die Abweichungen von der Theorie verschwinden, wenn man den Zucker durch Alkohol oder Essigsäure ersetzt. Mögen die Abweichungen in Zucker nun mit der Gärung zusammenhängen oder nicht, jedenfalls ist durch die Alkohol-

Tabelle II.

Bäckerhefe in m/20 KH_2PO_4 , m/5 Äthylalkohol. 20°. Dunkel.

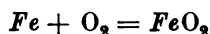
	Gefäß 1		Gefäß 2		Gefäß 3		Gefäß 4	
Einsatz	0,3 ccm KOH		0,3 ccm KOH		0,3 ccm KOH		0,3 ccm KOH	
Hauptraum	2 ccm Hefesusp. mit 8 cmm Hefe		2 ccm Hefesusp. mit 8 cmm Hefe		2 ccm Hefesusp. mit 8 cmm Hefe		2 ccm Hefesusp. mit 8 cmm Hefe	
Volumina in ccm .	v_F 2,3	v_G 13,07	v_F 2,3	v_G 13,89	v_F 2,3	v_G 13,65	v_F 2,3	v_G 13,88
Gefäßkonst. in qmm	$k_{O_2} = 1,23$		$k_{O_2} = 1,30$		$k_{O_2} = 1,28$		$k_{O_2} = 1,30$	
Gasraum	Luft		Luft		Luft		Luft	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
Nach 10'	— 16	19,6	— 14,5	18,8	— 15,0	19,2	— 14,5	18,8
Nach 3 Std. } 20'	— 43	53	— 41	53	— 41	52,7	— 40	52
Schütteln	↓		↓		↓		↓	
Gasraum	Luft		18% O ₂ , 82% CO		5% O ₂ , 95% N ₂		5,8% O ₂ , 94,2% CO	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
↓ 10'	— 19,5		— 13		— 19		— 7	
↓ 20'	— 39	48	— 25,5	83,2	— 38	48,6	— 14	18,2
			$n = 0,693$				$n = 0,88$	

Tabelle III.

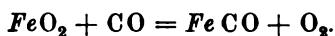
Bäckerhefe in m/20 KH_2PO_4 mit Alkohol oder Essigsäure. Dunkel.

Nr.	Verbrennliche Substanz	Gas Mischung in Vol.-%		Hemmung der Atmung in %	k_G
		CO	O ₂		
1	Äthylalkohol 0,22 mol.	81	19	29	10,4 (a)
		94,7	5,3	66	9,3 (b)
2	"	60	6,8	54	7,6 (a)
		89,4	10,6	54	7,2 (b)
3	"	40,1	4,4	55	7,5 (a)
		88,6	11,4	50	7,8 (b)
4	"	82	18	31	10 (a)
		94,2	5,8	62	9,9 (b)
5	Essigsäure 0,01 mol.	90	10	47	10 (a)
		95	5	65	10 (b)

versuche die Verteilungstheorie verifiziert. Die Primärreaktion der Atmung ist



und die Gleichung der Kohlenoxydwirkung



Der Zahlenwert der Konstanten k_G ist im Mittel 9, der Konstanten k_L im Mittel 7. Das Atmungsferment bindet also Sauerstoff mindestens siebenmal fester als Kohlenoxyd.

Berechnen wir noch das Verhältnis CO/O_2 , das mit $k = 9$ nötig wäre, um die Atmung um 99 % zu hemmen. Es ergibt sich $\text{CO}/\text{O}_2 = 890$. ein Verhältnis, das man zwar experimentell erzeugen, bei dem man aber die Atmung wegen des niedrigen Sauerstoffdruckes nicht mehr messen kann. Wird also die Atmung durch Kohlenoxyd nicht „vollständig“ gehemmt, so beruht dies nicht auf der Existenz von zwei verschiedenen Atmungsfermenten, sondern auf den Eigenschaften der Verteilungsgleichung.

8. Hefe in reinem Phosphat.

Bäckerhefe in reinem, von verbrennlicher Substanz freiem Phosphat ist ungesättigt ($\varepsilon < 1$). In diesem Falle ist die allgemeine Verteilungsgleichung

$$\frac{\varepsilon n}{1 - \varepsilon n} \cdot \frac{\text{CO}}{\text{O}_2} = k \quad (16a)$$

anzuwenden.

Bäckerhefe in reinem Phosphat atmet mit dem respiratorischen Quotienten 1, verbrennt also Zucker, der aus ihrer Substanz für die

Atmung mobilisiert wird. Um hier ε zu bestimmen, müssen wir die maximale Atmung durch Zusatz von Zucker (nicht etwa Alkohol oder Essigsäure) erzeugen. Ich finde die Atmung Q_{O_2} in reiner Phosphatlösung im Mittel gleich 5*, und die Atmung in 1 % Zucker, die maximal ist, im Mittel gleich 75. Der Sättigungsgrad ist also

$$\varepsilon = \frac{5}{75} = 0,067.$$

Wir berechnen mit $\varepsilon = 0,067$ und $k = 9$ das Verhältnis CO/O_2 , das nötig wäre, um die Atmung der ungesättigten Zellen um 70 % zu hemmen, und finden nach Gleichung (16 a) $CO/O_2 = 440$ gegenüber $CO/O_2 = 21$ für gesättigte Zellen.

Wir berechnen ferner das Verhältnis CO/O_2 für die Bedingung $n = 1$

$$\frac{CO}{O_2} = k \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}$$

und finden mit $\varepsilon = 0,067$ und $k = 9$ $CO/O_2 = 126$. Dies ist der Grenzwert von CO/O_2 , über den man hinausgehen muß, um in Zellen mit dem Sättigungsgrad $1/15$ eine Kohlenoxydwirkung zu erzeugen. Da nun bei unserer Versuchsanordnung das Verhältnis CO/O_2 höchstens 25 ist (96 % CO und 4 % O_2), so folgt, daß Kohlenoxyd die Atmung der ungesättigten Zellen nicht hemmen wird. Der Versuch ergab:

Bäckerhefe in m/20 KH_2PO_4 . 20°. Dunkel.

	95% N_2 , 5% O_2 40 cmm Zellen : 2 ccm Sauerstoffverbrauch cmm O_2	95% CO , 5% O_2 40 cmm Zellen : 2 ccm Sauerstoffverbrauch cmm O_2
In 20'	15,1	15,1
" 20	13,9	13,2
" 20	11,3	12,0
" 40	19,5	20,2
In 100'	59,8	60,5

Die Atmung, die in reiner Phosphatlösung langsam absinkt, wurde also in Übereinstimmung mit der Theorie durch 95 % Kohlenoxyd nicht gehemmt. —

Hefe in reiner Phosphatlösung ist nicht unter allen Umständen ungesättigt, sondern es kommt darauf an, unter welchen Bedingungen die Hefe gezüchtet worden ist. Hefe aus Bierbrauereien hat wie Bäckerhefe in reiner Phosphatlösung eine geringe Atmung, die aber durch

* $Q_{O_2} = \frac{\text{cmm } O_2}{\text{mg Hefe} \times \text{Stunden}}$, das Hefegewicht in Trockensubstanz ausgedrückt.

Zusatz von Zucker nicht wesentlich beschleunigt werden kann. Solche Hefe ist auch ohne Zusatz von Zucker gesättigt und sollte durch Kohlenoxyd gehemmt werden. Der Versuch ergab:

Hefe der Berliner Hochschulbrauerei in $m/20$ KH_2PO_4 . 20°. Dunkel.

	95% N_2 , 5% O_2 100 cmm Zellen : 2 ccm Sauerstoffverbrauch cmm O_2	95% CO_2 , 5% O_2 100 cmm Zellen : 2 ccm Sauerstoffverbrauch cmm O_2
In 5'	25	7
" 5	21	5
" 5	22	5

Die Atmung der Bierhefe wurde also in reinem Phosphat gehemmt, und zwar ebenso stark, wie die Atmung der Bäckerhefe in Glucosephosphat.

Anmerkungen zu 8.

1. Bei der Anwendung der Gleichung (16a) haben wir mit $k = 9$ gerechnet und damit angenommen, daß die Verteilung des Atmungsferments zwischen Kohlenoxyd und Sauerstoff die gleiche ist, ob die Zellen gesättigt sind oder nicht. Nach Gleichung (8) trifft diese Annahme nicht zu, sondern es ist wegen der kleineren Atmung k für ungesättigte Zellen größer als für gesättigte Zellen. Wahrscheinlich macht diese Änderung von k wenig aus.

2. Ungesättigte Zellen sind nicht nur gegen Kohlenoxyd unempfindlicher, sondern auch gegen andere atmungshemmende Substanzen. Z. B. wurde für Blausäure gefunden:

Bäckerhefe, 20°. Gasraum Luft.

In $m/20$ KH_2PO_4 ohne Glucose	In $m/20$ KH_2PO_4 mit $m/18$ Glucose
Atmungshemmung	Atmungshemmung
durch 10^{-5} n HCN: Null	durch 10^{-5} n HCN: 28%
durch 10^{-4} n HCN: Null	durch 10^{-4} n HCN: 80%
durch 10^{-3} n HCN: 61%	durch 10^{-3} n HCN: 100%

3. R. Emerson¹ hat in diesem Laboratorium gefunden, daß die Atmung der Chlorella unter gewissen Bedingungen durch Kohlenoxyd und Blausäure gehemmt wird, unter anderen Bedingungen nicht. Qualitativ ähnlich sind diese Erscheinungen bei Chlorella und Hefe quantitativ so verschieden, daß sie nicht nach dem gleichen Prinzip erklärt werden können.

9. Wirkung des Lichtes.

Nach Daten der ersten Arbeit² sank die Atmungshemmung in 95% Kohlenoxyd und 5% Sauerstoff von 71 auf 14%, wenn Hefe in

¹ R. Emerson, Journ. General Physiol. 10, 469, 1927.

² O. Warburg, diese Zeitschr. 177, 471, 1926.

Glucosephosphat belichtet wurde. Wenden wir auf diesen Fall die Gleichungen (8) und (9) an und rechnen, weil der Sättigungsgrad 1 ist, mit der einfachen Gleichung

$$\frac{n}{1-n} \cdot \frac{\text{CO}}{\text{O}_2} = k,$$

so war $k_{\text{dunkel}} = 7,8$ und $k_{\text{hell}} = 116$. Die Belichtung wirkte, als ob die Affinität des Atmungsferments zu Kohlenoxyd auf $1/15$ des Dunkelwertes verkleinert würde. Ist nun nach Abschnitt 6 der Minimalwert der Konstanten

$$k_{\text{CO}} = \frac{FeCO}{Fe \cdot p_{\text{CO}}} \quad (20)$$

im Dunkeln 280, so war er im hellen, bei der angewandten Lichtintensität 19.

Bei der Bestrahlung von Hefe in Kohlenoxyd sind die Wellenlängen 436, 546 und 578 $\mu\mu$ photochemisch wirksam¹. Das Atmungsferment ist eine gefärbte Substanz, deren Lichtabsorptionskurve nach Gleichung (12) bestimmt werden kann.

10. Andere Versuchsbedingungen und Objekte².

An Heferassen habe ich außer käuflichen Bäckerhefen und Bierhefen geprüft: Rasse M, Rasse XII, Rasse U und *Torula utilis*, alle vom Berliner Institut für Gärungsgewerbe; an Suspensionsflüssigkeiten außer Phosphat: Bierwürze, Citrat nach *Soerensen* (p_H 3), Glykokoll-Natronlauge nach *Soerensen* (p_H 10), die beiden letzteren mit 1 % Alkohol. Immer fand ich, daß 95 % Kohlenstoff und 5 % Sauerstoff die Atmung im Dunkeln stark hemmte. Wie die Hefen, verhielt sich ein *Staphylococcus albus*. Nicht gehemmt wurde die Atmung der roten Vogelblutzellen, eine Ausnahme, die insofern interessant ist, als diese Zellen vorwiegend aus Hämoglobin bestehen, das bei dem Atmungsversuch in Kohlenoxydhämoglobin verwandelt war.

Bei Versuchen mit Geweben tritt die Schwierigkeit auf, daß der niedrige Sauerstoffdruck zur Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff nicht ausreicht. Man hat hier den Fall, daß die Objektdicke größer ist als die „Grenzschichtdicke“³ und muß sich fragen, ob es unter solchen Umständen möglich ist, eine Atmungshemmung nachzuweisen.

¹ O. Warburg, diese Zeitschr. 177, 471, 1926.

² Vgl. hierzu auch J. B. S. Haldane, Nature 1927. J. B. S. Haldane fand, daß Kohlenoxyd-Sauerstoffgemische, die nach meinen Heferversuchen die Atmung hemmen, auf *Galleria mellonella* und *Lepidium sativum* lähmend wirken (Bewegung, Keimung).

³ O. Warburg, diese Zeitschr. 142, 317, 1923.

Wir denken uns eine Gewebelamelle und bezeichnen mit

x_{O_2} den Sauerstoffverbrauch des Gewebes *ohne* Kohlenoxyd,

x'_{O_2} „ „ „ „ *mit* „

q_{O_2} „ „ der Gewichtseinheit Gewebe *ohne* Kohlenoxyd,

q'_{O_2} den Sauerstoffverbrauch der Gewichtseinheit Gewebe *mit* Kohlenoxyd,

D die mittlere Dicke der Gewebelamelle,

d „ Grenzschnittdicke *ohne* Kohlenoxyd,

d' „ „ *mit* „

Ist D größer als d und auch größer als d' und beziehen wir alle x - und q -Werte auf gleiche Zeiten, so ist

$$\frac{x'_{O_2}}{x_{O_2}} = \frac{q'_{O_2} \cdot d'}{q_{O_2} \cdot d}. \quad (21)$$

Ist der Sauerstoffdruck in der umspülenden Lösung ohne und mit Kohlenoxyd gleich, so ist nach einer früher abgeleiteten Formel¹

$$\frac{d'}{d} = \sqrt{\frac{q_{O_2}}{q'_{O_2}}} \quad (22)$$

(22) in (21) eingesetzt, ergibt

$$\frac{x'_{O_2}}{x_{O_2}} = \sqrt{\frac{q'_{O_2}}{q_{O_2}}}, \quad (23)$$

das heißt, die verbrauchten Sauerstoffmengen verhalten sich wie die Wurzeln aus den Atmungsgrößen.

Es zeigt sich also, daß eine etwa vorhandene Atmungshemmung teilweise, aber nicht vollständig verdeckt wird. Sie wird teilweise verdeckt, weil sich um so mehr Gewebe an der Atmung beteiligt, je kleiner der Sauerstoffverbrauch der Gewichtseinheit ist. Die Atmungshemmung wird nicht vollständig verdeckt, weil die Gewebemenge, die atmet, nicht in demselben Maße zunimmt als der Sauerstoffverbrauch der

Gewichtseinheit abnimmt. Es ist nicht $\frac{d'}{d} = \frac{q_{O_2}}{q'_{O_2}}$, sondern $\frac{d'}{d} = \sqrt{\frac{q_{O_2}}{q'_{O_2}}}$.

Bei der Ausführung der Versuche empfiehlt es sich, mit und ohne Kohlenoxyd dieselbe Gewebelamelle zu benutzen, also die Gasgemische hintereinander auf dasselbe Objekt einwirken zu lassen. Anstatt die Gasgemische auszuwechseln, ist es bequemer, abwechselnd zu belichten

¹ Diese Zeitschr. 142, 317, 1923.

Tabelle IV.
Gewebe in 5% CO₂, 10% O₂, 85% CO.

Gewebe	Leber (Ratte)	Chorion (Ratte)	Retina (Ratte)	Embryo (Ratte)	Embryo (Huhn)	Jensen-Sarkom (Ratte)
Trockengewicht . . .	14 mg (Schnitt)	9,3 mg	3,4 mg (2 Häute)	2,3 mg (3 Embryonen)	2,6 mg (4 Embryonen)	4,6 mg (Schnitt)
Medium	Serum	Serum	Ringer, 0,2% Glucose	Serum	Ringer, 0,2% Glucose	Ringer, 0,2% Glucose
Gefaßvolumina in ccm	v_F 7 v_G 6,8	v_F 3 v_G 10,4	v_F 3 v_G 10,8	v_F 3 v_G 10,6	v_F 3 v_G 10,8	v_F 3 v_G 10,5
Temperatur	25°	37,5°	37,5°	37,5°	37,5°	25°
Druckänderung .	mm	mm	mm	mm	mm	mm
h bedeutet hell (75 Watt-Lampe 4 cm)	(20'd — 8) 20 h — 11 20 d — 4,5 20 h — 11 20 d — 5	20'd + 43 20 h + 23 20 d + 38 20 h + 23	20'd + 73 20 h + 56 20 d + 71 20 h + 47	30'd + 9 30 h + 7,5 30 d + 8,5 30 h + 6,0	40'd + 13 40 h + 10 40 d + 14,5 40 h + 12	30'h + 5,5 30 d + 7,5 30 h + 4,5 30 d + 7,5
d bedeutet dunkel	5% CO ₂ , 95% O ₂ 20' — 32	5% CO ₂ , 95% O ₂ 20' — 10	5% CO ₂ , 95% O ₂ 20' + 35	5% CO ₂ , 95% O ₂ 30' — 0,5	5% CO ₂ , 95% O ₂ 40' 0	
	5% CO ₂ , 10% O ₂ , 85% N ₂ 20' + 15	5% CO ₂ , 10% O ₂ , 85% N ₂ 20' + 46	5% CO ₂ , 10% O ₂ , 85% N ₂ 30' + 5,5			

und zu verdunkeln. Hinreichend starke Belichtung wirkt ja wie ein Ersatz des Kohlenoxyds durch ein indifferentes Gas. Hat man ferner Zellen, die gären, so ist es einfacher, statt der Wirkung auf die Atmung die Wirkung auf die Gärung zu messen.

Tabelle IV ist eine Zusammenstellung der Versuche. Das Verhältnis CO/O_2 war bei allen Versuchen gleich, nämlich 8,5. Große Wirkungen wurden gefunden für Leber, Chorion und Netzhaut, kleinere für Embryonen und ein Sarkom der Ratte, keine Wirkung (in der Tabelle nicht angeführt) für ein Sarkom¹ des Huhns.

Das Ergebnis ist, daß das Atmungsferment nicht nur in Hefe, sondern sehr allgemein mit Kohlenoxyd reagiert, und daß die hierbei entstehende Verbindung nicht nur in Hefe, sondern sehr allgemein durch Licht gespalten wird.

11. Verwandtschaft des Atmungsferments mit dem Hämoglobin.

Hämoglobin (Hb) verteilt sich zwischen Sauerstoff und Kohlenoxyd nach der Gleichung

$$\frac{\text{Hb O}_2 \cdot \text{CO}}{\text{Hb CO} \cdot \text{O}_2} = K. \quad (24)$$

Kohlenoxydhämoglobin wird, wie *John Haldane* 1897 fand², bei Belichtung gespalten, während Oxyhämoglobin im Lichte beständig ist. Deshalb nimmt K der Gleichung (24) bei Belichtung zu:

$$K_{\text{hell}} > K_{\text{dunkel}}. \quad (25)$$

Die Ausdrücke (24) und (25) fassen eine Reihe sehr spezieller Eigenschaften des Hämoglobins zusammen, die nach dem vorhergehenden auch Eigenschaften des Atmungsferments sind. Aus der Häufung gleicher und ganz spezieller Eigenschaften, die hier vorliegt, folgt, daß das Atmungsferment eine Eisenpyrrolverbindung ist, in der das Eisen wie im Hämoglobin an Stickstoff gebunden ist. Es war kein Zufall, daß das an Stickstoff gebundene Eisen der Blutkohlen Reaktionen zeigte³, die charakteristisch für das Atmungsferment sind.

Bedenkt man, daß Kohlenoxyd bei gewöhnlicher Temperatur ein chemisch fast indifferentes Gas ist, so bedarf der Schluß, daß Atmungsferment und Hämoglobin verwandt sind, keiner näheren Begründung. Notwendiger erscheint es zu begründen, warum Atmungs-

¹ Rous-Sarkom.

² Haldane und Smith, Journ. of Physiol. 20, 497, 1896. Hartridge und Roughton, Proc. Roy. Soc. B. 94, 336, 1923.

³ Warburg und Brefeld, diese Zeitschr. 145, 461, 1924.

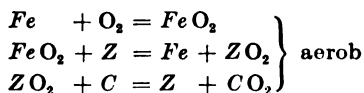
ferment und Hämoglobin nur verwandt und nicht identisch sind. Es genügen dazu die folgenden vier Zahlen¹:

Atmungsferment der Hefe	Hämoglobin
$\frac{FeO_2 \cdot CO}{FeCO \cdot O_2} = 9$	$\frac{HbO_2 \cdot CO}{HbCO \cdot O_2} \sim 0,01$
$\frac{FeO_2}{Fe \cdot p_{O_2}} \approx 2500$	$\frac{HbO_2}{Hb \cdot p_{O_2}} \sim 50$

Eine mit dem Hämoglobin verwandte Substanz, die weit verbreitet in Zellen vorkommt, ist das *Keilinsche Cytochrom*². Auch Cytochrom ist nicht identisch mit dem Atmungsferment. Denn Cytochrom reagiert nicht mit Kohlenoxyd³.

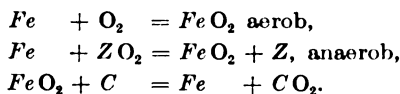
Es ist merkwürdig, daß Kohlenoxyd, obwohl es nicht mit dem Cytochrom reagiert, die Oxydation des Cytochroms an der Luft verhindert. Dem Anschein zum Trotz ist Cytochrom nicht autoxydabel, sondern es ist der aktivierte Sauerstoff des Atmungsferments, der das Cytochrom in der Zelle oxydiert.

Was die Funktion dieser interessanten Substanz anbetrifft, so gibt es zwei Möglichkeiten, zwischen denen man so lange nicht entscheiden wird, als es keine Methoden gibt, um das Eisen des Cytochroms und das Eisen des Atmungsferments zu bestimmen. Bezeichnen wir die Reduktionsform des Cytochroms mit *Z*, seine Oxydationsform mit *ZO*₂ — ohne damit über die Wertigkeit des Eisens in *ZO*₂ etwas aussagen zu wollen — und die verbrennende Substanz mit *C*, so ist die erste Möglichkeit



Dann wäre das Cytochrom eine „Peroxydase“ und als solche ein Bestandteil des Atmungsferments im weiteren Sinne.

Die zweite Möglichkeit ist



Dann wäre das Cytochrom *kein* Teil des Atmungsferments, sondern würde in der Zelle dieselbe Rolle spielen, wie das Hämoglobin außerhalb der Zelle.

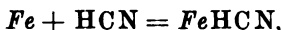
¹ *p*O₂ ist in Atmosphären ausgedrückt.

² D. Keilin, Proc. Roy. Soc. London, B, 98, 312, 1925; 100, 129, 1926.

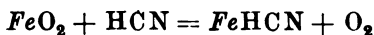
³ O. Warburg, Naturwissenschaften 15, H. 26, 1927 (Vortrag in der Royal Society vom 12. Mai 1927). D. Keilin, Le Cytochrome. Paris 1927 (Vortrag in der Société de biologie vom 27. Mai 1927.)

12. Blausäurewirkung bei verschiedenen Sauerstoffdrucken.

Würde die Blausäure, wie das Kohlenoxyd, mit der reduzierten Form des Atmungsferments reagieren, so wäre die Primärreaktion der Blausäurewirkung



die Bilanzgleichung



und das Gleichgewicht

$$\frac{FeO_2}{Fe(HCN)} \cdot \frac{HCN}{O_2} = K$$

und die Blausäurewirkung müßte in gleichem Maße von dem Sauerstoffdruck abhängig sein, wie die Kohlenoxydwirkung.

Versuchsanordnung.

Das Versuchsobjekt war Bäckerhefe, suspendiert in m/20 KH_2PO_4 und m/100 Essigsäure, die Suspension zur Herstellung stationärer Verhältnisse vor dem Versuch 2 Stunden mit Luft geschüttelt. Der Sauerstoffdruck wurde zwischen einer Atmosphäre und $1/30$ Atmosphäre variiert, die Blausäure war $1,5 \cdot 10^{-4}$ n.

Bei allen Versuchen mit niedrigen Sauerstoffdrucken ist die Gefahr, daß Sauerstoffmangel in den Zellen entsteht, wodurch Wirkungen vorgetauscht werden. Die Zellsuspensionen müssen so dünn wie möglich, die Suspensionsvolumina so klein wie möglich sein. Man muß sehr schnell schütteln und darf nicht, wie es sonst üblich ist, während des Ablesens anhalten. Endlich müssen die Versuchszeiten so kurz sein, daß die Destillation der Blausäure in den Kalilaugeeinsatz die Konzentration der Blausäure im Hauptraum nicht merklich vermindert. Die Anordnung ohne Kalilaugeeinsatz, mit der wir im allgemeinen die Blausäurewirkung messen, war bei niedrigen Sauerstoffdrucken wegen der zu großen Flüssigkeitsvolumina unzweckmäßig.

Tabelle V enthält ein Versuchsbeispiel. A_0 , die Atmung ohne Blausäure, ist zwischen 2,9 und 97 Vol.-% Sauerstoff gleich. A , die Atmung in $1,5 \cdot 10^{-4}$ n Blausäure, beträgt bei allen vier Sauerstoffdrucken rund 40% von A_0 , d. h., die Blausäurewirkung ist in den geprüften Grenzen unabhängig vom Sauerstoffdruck.

Es geht daraus hervor, daß die Blausäure nicht mit der reduzierten Form des Atmungsferments reagiert, wenn sie die Atmung hemmt. Bemerkenswerterweise ist auch das zweiwertige Eisen des Hämoglobins unempfindlich gegen Blausäure. Oxydiert man aber das Hämoglobin zu Methämoglobin, so tritt eine starke Affinität zu Blausäure auf. Methämoglobin reagiert, im Gegensatz zu Hämoglobin und Oxyhämoglobin, mit Blausäurekonzentrationen, wie sie für die Atmungshemmung in Betracht kommen.

Tabelle V.

Bäckerhefe in m/20 KH_2PO_4 , m/100 Essigsäure. 20°.

Gasraum	2,9 Vol.-% O_2	5,2 Vol.-% O_2	21 Vol.-% O_2	97 Vol.-% (Rest- N_2)
Hauptraum	1 ccm Suspension 5 cmm Zellen	1 ccm Suspension 5 cmm Zellen	1 ccm Suspension 5 cmm Zellen	1 ccm Suspension 5 cmm Zellen
Einsatz	0,5 ccm KOH	0,5 ccm KOH	0,5 ccm KOH	0,5 ccm KOH
Volumina in ccm .	v_F 1,5 v_G 15,27	v_F 1,5 v_G 15,25	v_F 1,5 v_G 14,77	v_F 1,5 v_G 15,13
Gefäßkonst. in qmm	$k_{\text{O}_2} = 1,43$	$k_{\text{O}_2} = 1,43$	$k_{\text{O}_2} = 1,38$	$k_{\text{O}_2} = 1,42$
Nach 30'	— 24,5 mm	— 25,0 mm	— 25,0 mm	— 25,0 mm
$A_0 =$	85 cmm	85,7 cmm	84,5 cmm	85,5 cmm
	↓	↓	↓	↓
	$1,5 \cdot 10^{-4} \text{ n HCN}$	$1,5 \cdot 10^{-4} \text{ n HCN}$	$1,5 \cdot 10^{-4} \text{ n HCN}$	$1,5 \cdot 10^{-4} \text{ n HCN}$
Nach 30'	— 11,0 mm	— 9,5 mm	— 10,5 mm	— 11,5 mm
$A =$	15,8 cmm	18,6 cmm	14,5 cmm	16,8 cmm
$\frac{A}{A_0} =$	0,45	0,39	0,41	0,46

18. Absorptionskoeffizient der Blausäure.

Für viele Versuche mit Blausäure ist die Kenntnis des Blausäuredampfdrucks wichtig. Eine einfache Bestimmungsmethode ist folgende:

In die Birne eines kegelförmigen Gefäßes¹ bringt man titrierte Kaliumcyanidlösung, in den Hauptraum eine Säurelösung, deren Säure genügen muß, um die Blausäure aus dem Kaliumcyanid in Freiheit zu setzen. Man hängt in den Thermostaten ein, gleicht Temperatur und Druck aus, gibt dann den Inhalt der Birne in den Hauptraum und schüttelt, bis der positive Druck nicht mehr zunimmt. Zu beachten ist, daß das Kaliumcyanid frei von Kohlensäure ist, was durch Zusatz von Bariumchlorid und Zentrifugieren leicht erreicht wird.

Ist x die Blausäuremenge in der Birne in Kubikmillimetern, H der entstandene Druck und P_0 der Normaldruck der Sperrflüssigkeit, α der Absorptionskoeffizient der Blausäure, T die absolute Versuchstemperatur, v_G das Volumen des Gasraums und v_F das Volumen der Flüssigkeit im Meßgefäß, so ist

$$x = \frac{H}{P_0} \left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha \right). \quad (26)$$

Beim Versuch war die Säurelösung im Hauptraum m/2 KH_2PO_4 , die Kaliumcyanidlösung in der Birne war n/10, ferner

$$\begin{aligned} x &= 4480 \text{ cmm} & v_F &= 2200 \text{ cmm} & v_G &= 13600 \text{ cmm} \\ H &= + 83 \text{ mm} & P_0 &= 10000 \text{ mm} \\ T &= 293^\circ \end{aligned}$$

woraus nach (26) folgt

$$\alpha = 240.$$

¹ Form vgl. Abb. 1, diese Zeitschr. 177, 471, 1926.

Kennt man α , so kann man für beliebige Gas- und Flüssigkeitsvolumina den Partialdruck H der Blausäure berechnen, der entsteht, wenn in ein Gefäß x cmm Blausäure hineingebracht werden

$$H = P_0 \cdot \frac{x}{v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha} \quad (26a)$$

Im allgemeinen ist v_G klein gegen $v_F \alpha$, so daß (26a) übergeht in

$$H = P_0 \cdot \frac{x}{v_F \alpha} \quad (26b)$$

Dann ist H unabhängig vom Volumen des Gasraums.

Bei dem in Tabelle V wiedergegebenen Versuch war der Dampfdruck der Blausäure, nach Gleichung (26b) berechnet, 0,14 mm. Man sieht daraus, daß Änderungen des Blausäuredrucks manometrisch ganz zu vernachlässigen waren.

14. Schwermetall in gärenden Zellen.

Die Bildung dissoziierender Blausäure- und Schwefelwasserstoffverbindungen ist eine dem Atmungs- und Gärungsferment gemeinsame Eigenschaft¹. Ist nun die Schwermetalltheorie der Atmung bewiesen, so ist es im Prinzip auch die Schwermetalltheorie der Gärung. Verstehen wir unter dem Gärungsferment mit *Pasteur* die Substanz, die den Sauerstoff innerhalb der Moleküle bei der Gärung verschiebt, so ist die energieliefernde chemische Reaktion der lebendigen Substanz allgemein eine Sauerstoffübertragung durch Schwermetall, in der Atmung eine Übertragung von freiem, in der Gärung eine Übertragung von gebundenem Sauerstoff.

Die Theorie verlangt, daß überall da, wo Gärung ist, Schwermetall ist. Zur Prüfung eignen sich Hefen, die stark gären und schwach atmen. Wir vergleichen sie mit Hefen, die schwach gären und stark atmen, und züchten beide Hefen in demselben Nährboden. Dabei zeigt sich folgendes:

Rasse U, anaerob gezüchtet	Torula utilis, aerob gezüchtet
Atmung: $Q_{O_2} = -17$	Atmung: $Q_{O_2} = -160$
Gärung: $Q_G^{N_2} = +170$	Gärung: $Q_G^{N_2} = +90$
Eisen: $0,9 \cdot 10^{-1}$ mg: g Trockensubstanz	Eisen: $1 \cdot 10^{-1}$ mg: g Trockensubstanz
Kupfer: $0,4 \cdot 10^{-1}$ mg: g Trockensubstanz	Kupfer: $0,7 \cdot 10^{-1}$ mg: g Trockensubstanz
Mangan: —	Mangan: —

Beide Hefen enthielten also reichlich Eisen und Kupfer, und zwar ungefähr gleich viel Eisen, obwohl die Atmung der Rasse U zehnmal so klein war wie die Atmung der Torula. Durch Extrapolation können

¹ O. Warburg, diese Zeitschr. **165**, 196, 1925; E. Negelein, ebendasselbst **165**, 203, 1925.

wir aus diesen Zahlen schließen, daß der Eisengehalt der Rasse U bei der Atmung Null nicht wesentlich kleiner sein würde.

Auch die gärenden Extrakte von Hefezellen enthalten reichlich Schwermetall. Ich züchtete Rasse U bei 6° in Bierwürze, die in Glasgefäßen hergestellt und deren Metallgehalt gemessen war. Nach v. Lebedew¹ extrahiert, ergab der nicht veraschte Saft pro Kubikzentimeter

4 . 10⁻³ mg Kupfer,

3 . 10⁻³ mg Eisen,

ein Metallgehalt, der beim Umrechnen auf Trockensubstanz zehnmal so groß wird, da der Saft rund 90 % Wasser enthält.

Experimentelles.

Die im Laboratorium in Glasgefäßen hergestellte Bierwürze wurde im Platintiegel verascht, der Metallgehalt der Aschenlösung nach der Cysteinmethode² bestimmt. Er war pro Kubikzentimeter Bierwürze 0,4 . 10⁻³ mg Cu und 0,5 . 10⁻³ mg Fe. In 86 ccm Bierwürze wurde eine Öse der Rasse U oder der Torula geimpft und bei 30° 36 Stunden lang Sauerstoff (Torula) oder geglühter Stickstoff (Rasse U) durchgeleitet. Die Ernte betrug 0,6 ccm Zellen. Aus diesen Zahlen und dem Metallgehalt der Würze und der Zellen kann man berechnen, daß zur Zeit der Ernte 1 Volumen Zellen rund 50mal soviel Eisen enthielt als 1 Volumen der sie umspülenden Würze. Der Stoffwechsel der Zellen wurde in Bierwürze gemessen, in der der Sättigungsgrad $\epsilon = 1$ ist. 0,5 ccm Zellen wurden im Platintiegel ohne Phosphatzusatz verascht (24 Stunden, Heraeus Ofen, ganz schwache Rotglut). Dann wurde mit 0,3 ccm n Salzsäure aufgenommen, mit Wasser auf 2,2 ccm aufgefüllt, 1½ Stunden im Quarzröhrchen auf 100° erhitzt und in je 0,1 ccm Aschenlösung der Pyrophosphat- und der Boratausschlag mit Cystein gemessen. — Der Lebedewsaft wurde unverascht und ohne ihn zu konzentrieren, nach der Cysteinmethode gemessen. 0,1 ccm gaben sehr beträchtliche Ausschläge. Die oben angegebenen Zahlen sind Minimalzahlen, da möglicherweise ein Teil des Metalls zu fest gebunden ist, um ohne Veraschung von der Cysteinmethode erfaßt zu werden.

15. Kohlenoxyd und Gärung.

Untersucht man die Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung, so ist zu beachten, daß Kohlenoxyd die Vermehrung mancher Zellen, z. B. von Hefe, hemmt. Bringt man Hefe in Bierwürze und mißt die Gärung, so steigt sie in Kohlenoxyd langsamer an, als in Stickstoff. Auf gleiche Zellenzahlen bezogen, ist jedoch die Gärung in beiden Gasen gleich.

Allgemein hat sich gezeigt, daß Kohlenoxyd die Gärung nicht hemmt, weder die Milchsäuregärung noch die alkoholische Gärung.

¹ A. v. Lebedew, Hoppe-Seyler 73, 447, 1911.

² O. Warburg, diese Zeitschr. 187, 255, 1927.

Selbst in Kohlenoxyd von 60 Atmosphären Druck fand ich keine Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung.

Experimentelles zu den Überdruckversuchen.

Abb. 3 erläutert die Versuchsanordnung.

40 ccm Hefesuspension wurden in die Bombe eingefüllt. Nach zweimaligem Spülen mit Stickstoff und Kohlenoxyd (10 Atmosphären) und Einpressen von 60 Atmosphären Kohlenoxyd wurde 2 bis 3 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Dann wurde die Hefesuspension zentrifugiert und der Glucosegehalt in der überstehenden Flüssigkeit polarimetrisch bestimmt. Bei einem Parallelversuch enthielt die Bombe statt 60 Atmosphären Kohlenoxyd 60 Atmosphären Stickstoff, die Hefesuspension 10^{-3} Mole Blausäure pro Liter, zur Hemmung der Atmung (in 60 Atmosphären Bombenstickstoff ist der Sauerstoffdruck etwa 0,3 Atmosphären).

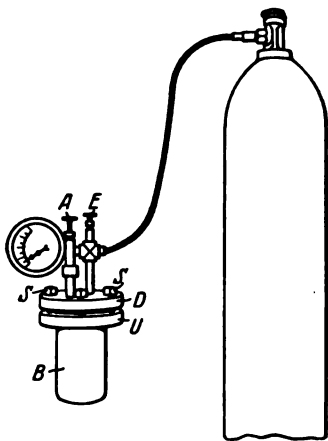


Abb. 3.

B Stahlbombe von 11 mm Wandstärke und 1,2 Liter Rauminhalt, innen emailliert, für 125 Atm. geprüft. E Einlaßventil mit Manometer. A Ablaßventil. D Deckel mit Sechskantschrauben S, auf Unterlage U befestigt.

Beispiel. Heferasse XII, aerob in Bierwürze gezüchtet. Suspension in $m/20$ KH_2PO_4 mit 0,5 % Glucose. Für jeden Versuch 40 ccm Hefesuspension mit 300 cmm (= 60 mg) Zellen. Versuchszeit 3 Stunden. Temperatur im Schüttelraum 22°.

Drehung im 2-dcm-Rohr (Na-Licht)
vor dem Versuch + 0,61°
Drehung im 2-dcm-Rohr (Na-Licht)
nach 3 Stunden 60 Atm. CO . + 0,22°
Drehung im 2-dcm-Rohr (Na-Licht)
nach 3 Stunden. 60 Atm. N₂ . . + 0,22°

Die Drehungsabnahmen waren also in Kohlenoxyd und Stickstoff gleich und betrugen 0,39°. Mit $[a]_D = + 52,5^\circ$ berechnet sich daraus ein Zuckerverbrauch von 148 mg für die Versuchszeit und 60 mg Hefe, oder ein Zuckerverbrauch von 0,82 mg pro Stunde und Milligramm Hefe. ($Q_G^{N_2} = Q_G^{CO} = 205$.)

16. Wirkung des Stickoxyds auf die Gärung.

Wie Kohlenoxyd, so bildet auch Stickoxyd mit einfachen und komplexen Schwermetallsalzen Verbindungen, die bei gewöhnlicher Temperatur dissoziieren. Man kennt reversible Stickoxydverbindungen des Eisens, Kobalts, Nickels, Mangans, Kupfers und anderer Schwermetalle¹, die beim Einleiten von Stickoxyd in die wässerigen Lösungen

¹ Hüfner, Zeitschr. f. physik. Chem. 59, 416, 1907; Kohlschütter und Sazanoff, Ber. 44, 1423, 1911; Manchot, ebendasselbst 47, 1601, 1914; 59, 2445, 1926.

der Salze entstehen; man kennt auch eine reversible Stickoxyd-Verbindung des Hämoglobins¹, das von *Hüfner* entdeckte Stickoxyd-Methämoglobin, in dem das Stickoxyd an Eisen gebunden ist. Bemerkenswert ist der starke Einfluß der Temperatur² auf die Dissoziation der Stickoxyd-Metallverbindungen, den man bei der Reinigung des Stickoxyds präparativ benutzt. Man läßt dabei Stickoxyd von Ferrosulfat bei gewöhnlicher Temperatur absorbieren und treibt das Gas durch gelindes Erwärmen wieder aus.

Die Bildung von Stickoxydverbindungen, die bei gewöhnlicher Temperatur dissoziieren, ist nicht weniger spezifisch für Schwermetalle, wie die Bildung reversibler Kohlenoxydverbindungen. Ich habe die Wirkung des Stickoxyds auf die Gärung untersucht und gefunden, daß das Gärungsferment eine dissoziierende Stickoxydverbindung bildet. Mit Hinblick auf das Verhalten der einfachen Stickoxyd-Metallverbindungen ist wichtig, daß man Stickoxyd, das bei niedriger Temperatur in Hefe fest gebunden ist, durch Erwärmen auf 37° austreiben kann.

Versuchsanordnung.

Abb. 4 zeigt einen Teil der Versuchsanordnung. Der Kolben *K* enthält saure Ferrosulfatlösung (50 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ + 90 ccm Wasser + 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure), der Trichter *T* eine Natriumnitritlösung (20 g Natriumnitrit in 50 ccm). *S* ist ein auf 40° einsteheendes Wasserbad, *a* und *b* sind Schwanzhähne, 1, 2 und 3 Waschflaschen mit konzentrierter Schwefelsäure, die zur Absorption des Stickstoffdioxyds dienen. Die Gefäße *I_a* und *I_b* denke man sich zunächst fort.

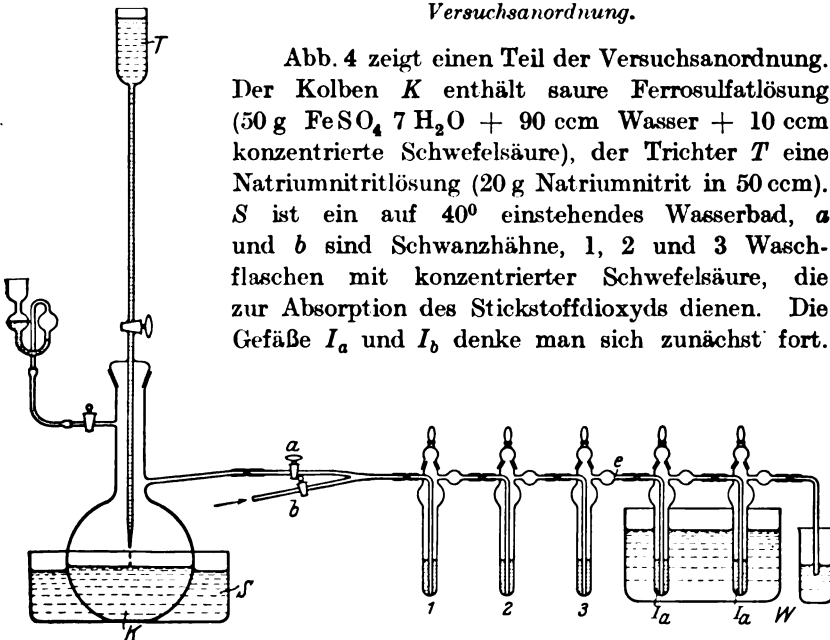


Abb. 4.

¹ *Hüfner* und *Reinbold*, Arch. Anat. Physiol. 1904, Suppl. II, S. 391; *Hartridge*, Journ. Physiol. 44, 34; *Anson* und *Mirsky*, ebendaselbst 60, 100.

² *V. Thomas*, C. r. 123, 943, 1896; Bull. Soc. Chim. (3) 19, 419.

Tropft Natriumnitrit in das Ferrosulfat, so entwickelt sich Stickoxyd, das mit dem Luftsauerstoff in KNO_3 bildet und durch den Schwanz des Hahnes *a* nach außen abgeleitet wird. Inzwischen wird das System von *b* aus mit (über Cu) geglühtem Stickstoff durchströmt. Ist die Luft durch den Stickstoff verdrängt, so wird durch Umstellen der Hähne *a* und *b* bewirkt, daß das Stickoxyd durch das System und der Stickstoff nach außen strömt. Bei *e* hat man dann reines Stickoxyd, das entweder als solches benutzt oder in einem Quecksilbergasometer mit indifferenten Gasen verdünnt wurde.

Die Gärung in Stickoxyd wurde manometrisch und polarimetrisch gemessen. Zur manometrischen Gärungsmessung wurden die Meßtröge mit Zell- oder Gewebesuspension gefüllt und mit ihren Manometern verbunden. Dann wurden Manometerkapillare und Meßtrög unter Schütteln des Meßtrogs sauerstofffrei gespült und ohne Unterbrechung des Gasstroms mit der NO-haltigen Gasmischung gefüllt. War die Gärung in NO gemessen, so wurden die Meßtröge unter dem Überdruck eines indifferenten Gases geöffnet, mit dem Gas einige Zeit durchströmt und zur Prüfung auf Reversibilität wieder geschlossen.

Zur polarimetrischen Gärungsmessung wurden bei *e* (Abb. 4) zwei Flaschen, I_a und I_b , mit Hefesuspension angesetzt, in einem durch Eisstücke auf 0° gehaltenen Wasserbad (*W*). Sie wurden von *e* aus sauerstofffrei gespült, dann mit Stickoxyd gesättigt, auf 20° erwärmt und 1 Stunde lang in Stickoxyd bei 20° gehalten. Dann wurde wieder auf 0° gekühlt, mit Stickstoff gewaschen, zentrifugiert und in der überstehenden Flüssigkeit der Zuckerverbrauch polarimetrisch bestimmt. Mit I_a und I_b stand eine Kontrollsuspension in dem Wasserbad *W*, die während der gesamten Versuchszeit mit Stickstoff durchströmt wurde. Sie machte alle Temperaturänderungen, denen I_a und I_b unterworfen waren, mit, und ergab die Normalgärung während der Versuchszeit.

Die Komplikation bei den Stickoxydversuchen ist, daß NO sich mit Luftsauerstoff und Wasser zu salpetriger und Salpetersäure umsetzt. Deshalb muß vor dem Einleiten des Stickoxyds der Sauerstoff aus den Gefäßen und Lösungen ausgetrieben sein.

Hemmung der Milchsäuregärung.

Als Versuchsobjekt benutzte ich Tumorschnitte. 95 Vol.-% Stickoxyd hemmte die Tumorgärung bei 37° um 50 bis 60 %. Wurde das Stickoxyd durch Stickstoff ersetzt, so stieg die Tumorgärung wieder auf ihren Normalwert.

Jensen-Sarkom in Ringerlösung bei 37,5°. 2,5 · 10⁻³ n NaHCO₃.
0,2% Glucose.

Versuch 1	Versuch 2
mm Druckänderung	mm Druckänderung
5% CO ₂ , 95% N ₂ : 10': + 18 10': + 17,5	5% CO ₂ , 95% N ₂ : 10': + 12 5% CO ₂ , 95% NO: 10': + 6
5% CO ₂ , 95% NO: 10': + 7	5% CO ₂ , 95% N ₂ : 10': + 10,5 10': + 11,5
5% CO ₂ , 95% N ₂ : 10': + 16,5	

Hemmung der alkoholischen Gärung.

Bei den Versuchen mit Hefe spielt die Temperatur eine wichtige Rolle. Je höher die Temperatur während der Stickoxydbehandlung ist, um so schlechter sind die Hemmungen reversibel. Hefe, deren Gärung bei 37° durch Stickoxyd gehemmt worden ist, gärt nach Entfernung des Stickoxyds nicht mehr, weder bei 37°, noch bei einer anderen Temperatur. Andererseits kann man das an Gärungsferment gebundene Stickoxyd um so leichter austreiben, je höher die Temperatur ist. Es sind also zwei verschiedene Reaktionen des Stickoxyds zu unterscheiden, eine reversible mit dem Gärungsferment und eine irreversible Nebenreaktion, die die Zellen tötet, um so schneller, je höher die Temperatur ist. Diese Nebenreaktion hat man nicht in Tumorzellen, die deshalb ein geeigneteres Objekt für NO-Versuche sind als Hefe.

1. *Beispiel.* Bäckerhefe manometrisch. Suspensionsflüssigkeit m/20 KH₂PO₄, m/18 Glucose.

Gefaß I 12 cmm Hefe in 2 ccm	Gefaß II 12 cmm Hefe in 2 ccm
10,7° 100% H ₂ 5': 9,9 cmm CO ₂ 5 : 10,3 cmm CO ₂ ↓	10,7° 80% H ₂ , 20% NO 5': 2,4 cmm CO ₂ 5 : 1,6 cmm CO ₂ ↓
10,7° 100% H ₂ 5': 11,4 cmm CO ₂ 5 : 10,3 cmm CO ₂ ↓	10,7° 100% H ₂ 5': 3,2 cmm CO ₂ 5 : 3,2 cmm CO ₂ ↓
37,5° 100% H ₂ 1. e 5': 91 cmm CO ₂ 2. e 5 : 95 cmm CO ₂ 8. e 5 : 85 cmm CO ₂ 9. e 5 : 88 cmm CO ₂	37,5° 100% H ₂ 1. e 5': 45 cmm CO ₂ 2. e 5 : 52 cmm CO ₂ 8. e 5 : 85 cmm CO ₂ 9. e 5 : 89 cmm CO ₂

20 % NO hemmte also die Gärung bei 11° um 85 %. Wurde das NO bei 11° durch H_2 ersetzt, so betrug die Gärungshemmung 70 %. Diese Hemmung verschwand bei 37,5°.

2. *Beispiel.* Bäckerhefe polarimetrisch. Suspension in m/2 KH_2PO_4 , 0,48 % Glucose. Die Suspension enthielt pro Kubikzentimeter 10 cmm (= 2 mg) Zellen. Vier Gefäße wie I, Abb. 4, mit 15 ccm Zellsuspension, I_a und I_b mit 100 % NO, II_a und II_b mit N_2 durchströmt. Durchströmungszeiten: I_a und I_b : 70 Minuten mit N_2 bei 0°, 5 Minuten mit NO bei 0°, 60 Minuten mit NO bei 20°, 10 Minuten mit NO bei 0°, 90 Minuten mit N_2 bei 0°. II_a und II_b : wie I_a und I_b , aber immer mit N_2 .

Drehung im 2-dcm-Rohr (Na-Licht) vor dem Versuch: + 0,51°, Flüssigkeit aus I_a und I_b : + 0,50°, Flüssigkeit aus II_a und II_b : + 0,25°.

In Stickstoff war also pro Kubikzentimeter Suspension 2,35 mg Glucose vergoren. In Stickoxyd war die Gärung fast Null.

Ein Teil der Suspensionen aus I und II wurde zur Prüfung auf Reversibilität benutzt. Manometrisch:

1 ccm Suspension aus Gefäß II direkt bei 20° in N_2	1 ccm Suspension aus Gefäß I direkt bei 20° in N_2	1 ccm Suspension aus Gefäß I bei 20°, nachdem vorher 1 Stunde bei 37,5° in N_2 geschüttelt worden war in N_2
10': 68 cmm CO_2 10 : 69 cmm CO_2	10': 34 cmm CO_2 10 : 36 cmm CO_2	10': 58 cmm CO_2 10 : 56 cmm CO_2

Die vorher vollständige Gärungshemmung betrug also 49 %, wenn bei 0° mit N_2 durchströmt war, und 17 %, wenn bei 37,5° mit N_2 geschüttelt war.

Massenwirkungsgesetz und Kolloide.

Von

Hans H. Weber.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der
Universität Berlin.)

(Eingegangen am 9. September 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Inhalt.	Seite
I. Einleitung	381
II. Die H^+ - und OH^- -Bindungskurve mehrwertiger Elektrolyte . .	382
III. Die Änderungen der Normalitätsrestkurve mehrwertiger Elektrolyte bei Änderungen ihrer Ionenaktivität und der Bildung undissoziierter Salze . . , . .	388
IV. Der isoelektrische Punkt bei wahrer Salzbildung	400

I. Einleitung.

*L. Michaelis*¹ hat in seinen grundlegenden, formalen Untersuchungen über spezielle Anwendungsmöglichkeiten des Massenwirkungsgesetzes eine große Anzahl von Formulierungen aufgestellt, die die Reaktionsweise kolloidaler Ampholyte vom Eiweißkörpertypus mit einfachen Ionen oder Molekülen beherrschen sollten, falls das Massenwirkungsgesetz in diesen Fällen gilt.

Um das heute hierüber vorliegende experimentelle Material zu prüfen, wie weit das Massenwirkungsgesetz tatsächlich gilt, ist es notwendig, die von *Michaelis* abgeleiteten Beziehungen zum Teil etwas anders zu formulieren und gelegentlich auch etwas zu korrigieren. Einige Vorschläge in dieser Richtung, die sich bei eigener experimenteller Beschäftigung mit der Physikochemie gewisser Proteine² ergaben, sollen hier kurz angegeben werden.

¹ *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin, Julius Springer, 1922.

² *H. H. Weber*, diese Zeitschr. 158, 443 und 473, 1925 und die folgende Mitteilung.

II. H'- und OH'-Bindungskurve mehrwertiger Elektrolyte.

Die heute wohl recht allgemein anerkannte Ansicht, daß die Reaktion der Eiweißkörper mit H' und OH' ein echtes chemisches Dissoziationsgleichgewicht ist, beruht

1. darauf, daß die chemische Konstitution des Proteinmoleküls mit seinen basischen N-haltigen und sauren Carboxylgruppen diese Deutung nahelegt;

2. auf der Konstanz der Äquivalentgewichte für H' und OH' in verschiedenartigem Elektrolytmilieu (bei Zusatz verschiedenartiger Säuren, Basen und Salze).

Der Verlauf der H'- und OH'-Bindungskurven im einzelnen scheint dagegen dieser Anschauung unter Umständen auf den ersten Blick geradezu zu widersprechen: Proteine sind polyvalente Elektrolyte, ihre Dissoziationsgleichungen müßten also Gleichungen höherer Potenz sein. In Wirklichkeit aber läßt sich besonders die H'-Bindungskurve der Proteine (auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes) im allgemeinen mit recht guter Annäherung durch die Dissoziationsgleichung eines einwertigen Elektrolyten, also einer einwertigen Base darstellen, deren Dissoziationskonstante im allgemeinen als „mittlere“ Basen-Dissoziationskonstante des betreffenden Proteins bezeichnet wird. Diese Gleichungen haben also keinen tatsächlichen physikalischen Sinn, sondern nur formal deskriptive Bedeutung. Es fragt sich also, ob eine Reaktion der Proteine mit H' und OH' nach dem Massenwirkungsgesetz überhaupt die H'- und OH'-Bindung der Eiweißkörper erklären kann. Ob dieses möglich ist, hängt davon ab, ob diese Kurve durch die Dissoziationsgleichung eines *vielwertigen* Elektrolyten, die für Proteine selbstverständlich zu fordern ist, ebensogut dargestellt werden kann, wie durch die *einwertige*, physikochemisch unmögliche Dissoziationsformel. Anderenfalls würde ein Widerspruch bestehen, zwischen den am Anfang dieses Kapitels angeführten Erwägungen, die für eine Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes sprechen, und den Ergebnissen, die sich aus der Diskussion der H'- und OH'-Bindungskurven ergeben.

Das hier für die H'- und OH'-Bindung durch Proteine ausgeführte Problem liegt auch bei der Frage der intermediären Ferment-Substratverbindung vor. Alle die zahlreichen bisher bestimmten Affinitäts- bzw. Dissoziationskonstanten der Fermentsubstratverbindungen sind in sehr guter Übereinstimmung mit den experimentellen Befunden so aufgestellt, als wenn ein einwertiges Fermentmolekül mit einem einwertigen Substratmolekül reagierte. Daß das so ist, muß bei dem kolloidalen Charakter der Fermentkomplexe zweifelhaft erscheinen.

Obwohl es auf den ersten Blick unwahrscheinlich aussehen könnte, gibt es doch ganz sichere Fälle, in denen eine einwandfrei dem Massen-

wirkungsgesetz folgende Elektrotitrationskurve eines *mehrwertigen* Elektrolyten sehr gut nach der Dissoziationsformel eines *einwertigen* Elektrolyten berechnet werden kann. Dieses zeigt die *Meyerhofsche* Elektrotitrationskurve der Hexosediphosphorsäure. Diese hat nur zwei — und zwar weit auseinanderliegende — deutlich erkennbare Dissoziationsstufen, von denen also jede die Dissoziation zweier Valenzen desselben Moleküls repräsentiert. Denn diese Säure ist ja vierwertig. Und trotzdem läßt sich jede dieser beiden Stufen sehr gut nach der Dissoziationsgleichung eines einwertigen Elektrolyten berechnen¹.

Will man die allen diesen Fällen zugrunde liegenden Verhältnisse verstehen, so ist folgendes zu berücksichtigen: die H' - und OH' -Bindungskurve eines mehrwertigen Elektrolyten ist gar keine Dissoziationskurve im klassischen Sinne. Sie gibt nicht den Bruchteil der molaren Konzentration des Elektrolyten an, der entweder als *Ion* oder aber als *Molekül* vorhanden ist, sondern das Verhältnis der undissoziierten und dissoziierten *Valenzen*. Sind z. B. durch die Elektrotitration alle Moleküle in Ionen überführt, so biegt im Falle eines mehrwertigen Elektrolyten die Titrationskurve nicht in die einer ungepufferten Lösung um, da ja nun die Dissoziation der zweiten — bzw. noch weiterer — Valenzen beginnt. Die Auswertung der Elektrotitrationskurve (d. h. die H' - bzw. OH' -Bindungskurve) gibt also für mehrwertige Elektrolyte keine Dissoziations- sondern eine Normalitätskurve.

Es soll nun die Abhängigkeit der Normalitätskurven von der $[H-]$ und den Dissoziationskonstanten (K_1, K_2 usw.) formuliert werden, unter der Voraussetzung der Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes. Aktivitätstheoretische Gesichtspunkte werden dabei zunächst nicht berücksichtigt. Die aktive Konzentration aller vorkommenden Moleküle und Ionenarten des mehrwertigen Elektrolyten wird ihrer Gesamtkonzentration gleichgesetzt.

Für diese Ableitung ist es zweckmäßig, analog dem *Michaelisschen* Dissoziationsgrad und Dissoziationsrest² die Begriffe Normalitätsgrad und Normalitätsrest einzuführen. Der Normalitätsrest ($\bar{q}$) definiert sich als das Verhältnis der undissoziierten Valenzen (undissoziierten Normalität) zur Gesamtnormalität. Für den Fall einer n -wertigen schwachen Säure werden die Begriffe eingeführt:

A	=	molare Konzentration undissoziierter Moleküle,
A'	=	„ „ einwertiger Anionen,
A''	=	„ „ zweiwertiger „ usw.

¹ O. Meyerhof und J. Suranyi, diese Zeitschr. 178, 427, 1926.

² L. Michaelis, a. a. O., S. 41.

der schwachen Säure und K_1, K_2, K_3 bis K_n als ihre Dissoziationskonstanten der ersten bis n -ten Dissoziationsstufe. Die Gesamtnormalität ist dann gleich der Gesamtmolarität des Elektrolyten multipliziert mit seiner Wertigkeit, also gleich

$$n(A + A' + A'' \dots).$$

Die undissoziierte Normalität ist gleich der Summe der undissoziierten Normalität der Moleküle und der einzelnen Ionenarten, also gleich

$$n \cdot A + (n - 1) A' + (n - 2) A'' \text{ usw.}$$

Der Normalitätsrest ist also beschrieben durch die Gleichung

$$\frac{nA + (n - 1) A' + (n - 2) A'' \dots}{n(A + A' + A'' \dots)}. \quad (1)$$

Die einzelnen Ionenarten als Funktion der undissoziierten Moleküle, der Dissoziationskonstanten und der $[H]$ werden nach dem Massenwirkungsgesetz ausgedrückt

$$\left. \begin{aligned} A' &= \frac{AK_1}{h} \\ A'' &= \frac{A'K_2}{h} = \frac{AK_1K_2}{h^2} \\ A''' &= \frac{A''K_3}{h} = \frac{AK_1K_2K_3}{h^3} \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

Diese Werte in die Gleichung für den Normalitätsrest eingesetzt, ergeben

$$\bar{q} = \frac{nA + (n - 1) \frac{AK_1}{h} + (n - 2) \frac{AK_1K_2}{h^2} + \dots + (n - n) \frac{AK_1 \dots K_n}{h^n}}{n \left(A + \frac{AK_1}{h} + \frac{AK_1K_2}{h^2} + \dots + \frac{AK_1 \dots K_n}{h^n} \right)}$$

oder nach Division von Zähler und Nenner durch $n \cdot A$

$$\bar{q} = \frac{1 + \frac{n - 1}{n} \cdot \frac{K_1}{h} + \frac{n - 2}{n} \cdot \frac{K_1K_2}{h^2} + \dots + \frac{n - n}{n} \cdot \frac{K_1 \dots K_n}{h^n}}{1 + \frac{K_1}{h} + \frac{K_1K_2}{h^2} + \dots + \frac{K_1 \dots K_n}{h^n}} \quad (3)$$

Konsequenzen und Anwendungsbereich dieser allgemeinen Formel sollen nun an einfacheren Beispielen gezeigt werden. Hierbei wird sich auch im Sinne des eingangs gestellten Problems ergeben, unter welchen Bedingungen die H^- bzw. OH^- -Bindungskurve (Normalitätsrestkurve) eines mehrwertigen Elektrolyten formal richtig als Dissoziationskurve eines einwertigen Elektrolyten berechnet werden kann.

Für eine zweiwertige Säure ist $n = 2$, also lautet Gleichung (3)

$$\bar{\varphi} = \frac{1 + \frac{1}{2} \frac{K_1}{h}}{1 + \frac{K_1}{h} + \frac{K_1 K_2}{h^2}}.$$

Für eine dreiwertige Säure ist $n = 3$ und

$$\bar{\varphi} = \frac{1 + \frac{2}{3} \frac{K_1}{h} + \frac{1}{3} \frac{K_1 K_2}{h^2}}{1 + \frac{K_1}{h} + \frac{K_1 K_2}{h^2} + \frac{K_1 K_2 K_3}{h^3}}.$$

Es ist nun festzustellen, wie groß die Dissoziationskonstanten einer mehrwertigen Säure für eine gegebene $\bar{\varphi}'$, also OH'-Bindungskurve sind. Dazu sind so viel Gleichungen nötig, wie Unbekannte, d. h. Dissoziationskonstanten vorhanden sind. Diese Gleichungen ergeben sich aus den angeführten Gleichungen für $\bar{\varphi}$, indem in die $\bar{\varphi}$ -Gleichung ein bestimmter Wert für $h = h_1$ und der dazu gehörige Betrag für $\bar{\varphi} = \bar{\varphi}_1$ eingesetzt wird. Analog verfährt man für verschiedene Werte von h und gewinnt so beliebig viele Gleichungen mit verschiedenen Werten von h und $\bar{\varphi}$, die alle die unbekannten Dissoziationskonstanten gemeinsam haben. Für eine zweiwertige Säure braucht man zwei solcher Gleichungen¹

$$\bar{\varphi}_1 = \frac{1 + \frac{1}{2} \frac{K_1}{h_1}}{1 + \frac{K_1}{h_1} + \frac{K_1 K_2}{h_1^2}} \quad \text{und} \quad \bar{\varphi}_2 = \frac{1 + \frac{1}{2} \frac{K_1}{h_2}}{1 + \frac{K_1}{h_2} + \frac{K_1 K_2}{h_2^2}}.$$

Löst man diese Gleichungen nach K_1 bzw. K_2 auf, so ergibt sich

$$\left. \begin{aligned} K_1 &= \frac{h_1^2 \left(\frac{1}{\bar{\varphi}_1} - 1 \right) - h_2^2 \left(\frac{1}{\bar{\varphi}_2} - 1 \right)}{h_2 \left(\frac{1}{2\bar{\varphi}_2} - 1 \right) - h_1 \left(\frac{1}{2\bar{\varphi}_1} - 1 \right)} \\ K_2 &= \frac{h_1^3 \left(\frac{1}{\bar{\varphi}_1} - 1 \right) + h_1 \left(\frac{1}{2\bar{\varphi}_1} - 1 \right)}{K_1 \left(\frac{1}{\bar{\varphi}_1} - 1 \right) + h_1 \left(\frac{1}{2\bar{\varphi}_1} - 1 \right)} \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

und

¹ Auf die hier angewandte Methode, die Normalitätsrestkurve nach ihren Dissoziationskonstanten aufzulösen, machte mich bei einer Unterhaltung über die Analyse der Elektrotitrationskurve der Hexosediphosphorsäure Herr Prof. O. Meyerhof aufmerksam. Ich hatte ihm zunächst als die beiden Gleichungen für die Berechnung von K_1 und K_2 die unveränderte $\bar{\varphi}$ -Gleichung und deren Differentialgleichung vorgeschlagen. Dies führt theoretisch zu demselben Resultat, ist aber viel umständlicher und im Falle graphischer Differentiation auch ungenauer.

$$\begin{aligned}
 K_1 &= \frac{h_1^3 \left(\frac{1}{Q_1} - 1 \right) - \frac{h_2^3}{K_2} \left(\frac{1}{Q_2} - 1 \right)}{h_2^3 \left(\frac{2}{3Q_2} - 1 \right) + h_2 \left(\frac{1}{3Q_2} - 1 \right) - \frac{h_1^3}{K_2} \left(\frac{2}{3Q_1} - 1 \right) - h_1 \left(\frac{1}{3Q_1} - 1 \right)}, \\
 K_2 &= \frac{\left[h_3^3 \left(\frac{1}{Q_3} - 1 \right) - h_3 \left(\frac{1}{Q_3} - 1 \right) \right] \left[h_2^3 \left(\frac{2}{3Q_2} - 1 \right) - h_2 \left(\frac{1}{3Q_2} - 1 \right) \right] - \left[h_1^3 \left(\frac{1}{Q_1} - 1 \right) - h_1 \left(\frac{1}{Q_1} - 1 \right) \right] \left[h_3^3 \left(\frac{2}{3Q_3} - 1 \right) - h_3 \left(\frac{1}{3Q_3} - 1 \right) \right]}{\left[h_3^3 \left(\frac{1}{Q_3} - 1 \right) - h_3 \left(\frac{1}{Q_3} - 1 \right) \right] \left[h_1^3 \left(\frac{1}{Q_1} - 1 \right) - h_1 \left(\frac{1}{Q_1} - 1 \right) \right] - \left[h_2^3 \left(\frac{2}{3Q_2} - 1 \right) - h_2 \left(\frac{1}{3Q_2} - 1 \right) \right] \left[h_3^3 \left(\frac{2}{3Q_3} - 1 \right) - h_3 \left(\frac{1}{3Q_3} - 1 \right) \right]}, \\
 K_3 &= \frac{h_1^3 \left(\frac{1}{Q_1} - 1 \right) + \frac{h_2^3}{K_2} \left(\frac{2}{3Q_2} - 1 \right) + h_1 \left(\frac{1}{3Q_1} - 1 \right)}{h_1^3 \left(\frac{1}{Q_1} - 1 \right) - h_2 \left(\frac{1}{Q_2} - 1 \right) - \frac{h_3^3}{K_2} \left(\frac{1}{Q_3} - 1 \right) - h_3 \left(\frac{1}{Q_3} - 1 \right)}.
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

Für die Dissoziationskonstanten einer dreiwertigen Säure ergibt sich nach diesem Verfahren Gleichung (5).

Analog lassen sich die Dissoziationskonstanten für jede Säure jeder Wertigkeit ausrechnen. Allerdings nimmt die Unhandlichkeit der Formeln mit wachsender Wertigkeit stark zu. Dafür ist diese Art der Ausrechnung auch theoretisch völlig korrekt und unabhängig von der Lage der Dissoziationskonstanten zueinander. Sie ist auch für beliebige nahe beieinander liegende Konstanten verwendbar, was immer bei sehr hochwertigen, bisweilen aber auch schon bei einfachen Elektrolyten von Bedeutung ist¹.

Die Frage, welchen Betrag die Dissoziationskonstanten einer mehrwertigen Säure haben müssen, damit ihre Normalitätsrestkurve der Dissoziationsrestkurve einer einwertigen Säure gleicht, beantwortet sich auf folgende Weise:

Der Dissoziationsrest einer einwertigen Säure ist bestimmt durch die Formel²

$$\varphi = \frac{1}{1 + \frac{K}{h}},$$

worin K die Dissoziationskonstante der einwertigen Säure ist, also ist

$$\frac{1}{\varphi} = 1 + \frac{K}{h}.$$

¹ Vgl. z. B. O. Meyerhof und K. Lohmann, diese Zeitschr. 185, 113, 1927.

² Vgl. L. Michaelis, a. a. O., S. 45.

Da in diesem Falle ja nun die $\bar{\varrho}$ -Kurve der mehrwertigen und die ϱ -Kurve der einwertigen Säure gleich verlaufen sollen, kann in die nach K_1, K_2 , usw. aufgelösten Formeln der $\bar{\varrho}$ -Kurve für $\frac{1}{\bar{\varrho}_1}, \frac{1}{\bar{\varrho}_2}$ usw.

$1 + \frac{K}{h_1}, 1 + \frac{K}{h_2}$ usw. eingesetzt werden. Die Ausrechnung ergibt dann

$$\left. \begin{array}{l} \text{bei einer zweiwertigen Säure} \\ K_1 = 2 K \text{ und } K_2 = \frac{1}{2} K, \\ \text{bei einer dreiwertigen Säure} \\ K_1 = 3 K \text{ und } K_2 = K \text{ und } K_3 = \frac{1}{3} K, \\ \text{bei einer vierwertigen Säure} \\ K_1 = 4 K \text{ und } K_2 = \frac{3}{2} K \text{ und } K_3 = \frac{2}{3} K \text{ und } K_4 = \frac{1}{4} K. \end{array} \right\} \quad (6)$$

K ist hier immer die Dissoziationskonstante der einwertigen Säure, deren Dissoziationsrestkurve der Normalitätsrestkurve der betreffenden mehrwertigen Säure gleicht.

Der Wert für dieses K wird in der Literatur bisher allgemein als „mittlere“ Dissoziationskonstante angeführt. Nun zeigen die angeführten Werte für die tatsächlichen Dissoziationskonstanten mehrwertiger Säuren (K_1, K_2 usw.), daß diese sogenannte „mittlere“ Dissoziationskonstante allerdings dem geometrischen Mittel von K_1, K_2, K_3 usw. entspricht. Eine „mittlere“ Dissoziationskonstante wird in der Literatur aber im allgemeinen nur dann angegeben, wenn die Normalitätsrestkurve des mehrwertigen Elektrolyten ohne erkennbare Stufen verläuft und weitgehend oder ganz durch die Dissoziationsrestkurve eines einwertigen Elektrolyten darstellbar ist. Da dieses aber nur dann der Fall ist, wenn K_1, K_2, K_3 usw. in ganz bestimmten [für zwei- bis vierwertige Säuren oben (6) angegebenen] Abständen um ihr geometrisches Mittel herumliegen, bedeutet die sogenannte „mittlere“ Dissoziationskonstante die mittlere Dissoziationskonstante in einem besonderen Spezialfall. Es erscheint deshalb zweckmäßig, sie besonders, und zwar als „fiktive“ Dissoziationskonstante zu bezeichnen, wodurch zugleich angedeutet wird, daß solche „fiktiven“ Konstanten zu massenwirkungstheoretischen Berechnungen (z. B. über die Lage des isoelektrischen Punktes bei Ampholyten auf Grund der *Michaelisformel*) unbrauchbar sind.

Die hier für mehrwertige schwache Säuren ausgeführten Formeln gelten genau ebenso für Basen, wenn man überall $\frac{K_w}{h}$ für h einsetzt.

Da, wie oben abgeleitet, unter Umständen die Normalitätsrestkurve mehrwertiger Elektrolyte durch die einwertige Massenwirkungsformel dargestellt wird, besteht kein Widerspruch zwischen dieser Tatsache und den zu Anfang angeführten allgemeinen Gesichts-

punkten zugunsten klassischer chemischer Reaktionsweise der Eiweißkörper mit H' und OH' .

Die angegebenen Formeln gestatten ferner die Berechnung der einzelnen Dissoziationskonstanten aller Eiweißkörper, für die die H' - bzw. OH' -Bindungskurve und die Wertigkeit $\left(= \frac{\text{Äquivalentgewicht}}{\text{Molekulargewicht}} \right)$ bekannt ist.

Alle behandelten Folgerungen ergeben sich selbstverständlich genau wie aus der Normalitätsrestformel auch aus der Formel des Normalitätsgrades ($\bar{\alpha}$). Als Normalitätsgrad definiert sich in Analogie zum Normalitätsrest das Verhältnis der dissoziierten zur Gesamtnormalität. Die $\bar{\alpha}$ -Formel soll ohne Ableitung für eine schwache n -wertige Säure angeführt werden,

$$\bar{\alpha} = \frac{\frac{1}{n} \frac{K_1}{h} + \frac{2}{n} \frac{K_1 K_2}{h^2} + \dots + \frac{n}{n} \frac{K_1 \dots K_n}{h^n}}{1 + \frac{K_1}{h} + \frac{K_1 K_2}{h^2} + \dots + \frac{K_1 \dots K_n}{h^n}}, \quad (7)$$

da ihre Ableitung der Ableitung der $\bar{\varphi}$ -Formel prinzipiell gleich ist.

Außerdem ergab die Durchsicht der Literatur, daß der $\bar{\alpha}$ -Formel sehr verwandte Überlegungen bereits vorliegen von *Linderström-Lang*¹ und besonders von *Reiner*². Die Formel von *Reiner* unterscheidet sich von der hier angeführten nur durch die Einführung einiger speziellerer Annahmen über die Lage der verschiedenen Dissoziationskonstanten zueinander und dadurch, daß sie das Verhältnis der dissoziierten *Valenzen* zu der Gesamtmolarität angibt, anstatt zu der Gesamtnormalität. Wegen dieser Abweichungen ist trotz der prinzipiellen Priorität der *Reinerschen* Überlegungen die definitionsgemäße allgemeine Normalitätsgradformel hier angeführt.

III. Die Änderungen der $\bar{\varphi}$ -Kurve mehrwertiger Elektrolyte bei Änderungen ihrer Ionenaktivität und der Bildung undissoziierter Salze.

Daß Kräfte, die an den Ionen eines schwachen Elektrolyten angreifen, seine Dissoziation beeinflussen, ist seit langem bekannt. Diese Kräfte können als interionische Kräfte die Aktivität der Teilchen des Elektrolyten ändern oder durch Bildung undissoziierter Salze die Konzentration der Elektrolytionen vermindern.

Bei einwertigen Elektrolyten wirkt die Änderung der Aktivität wie der Konzentration ihrer Ionen bei unveränderter Aktivität und Konzentration der Moleküle auf die H' - bzw. OH' -Bindungskurve gleichartig. Jede Verminderung der Aktivität wie der Konzentration

¹ *Linderström-Lang* und *Ellen Lund*, C. r. d. Tr. d. Laboratoire Carlsberg 16, Nr. 5, 29, 1926, doch ist diese Formel infolge ganz andersartiger Untersuchungsziele vollkommen unentwickelt.

² *L. Reiner*, Kolloidzeitschr. 40, 327, 1926.

ihrer Ionen wirkt wie eine proportionale Vergrößerung ihrer Dissoziationskonstante. Eine Herabsetzung der Ionenaktivität (durch interionische Kräfte) wie der Ionenkonzentration (durch Bildung undissoziierter Salze) auf die Hälfte ändert die H' - bzw. OH' -Bindungskurve so, als wäre die Dissoziationskonstante statt dessen verdoppelt¹.

Es erhebt sich nun die Frage, wieweit dieser Satz auf mehrwertige Elektrolyte übertragbar ist.

1. Übt eine gegebene Verminderung der aktiven Konzentration mehrwertiger Ionen auf die H' - bzw. OH' -Bindungskurve denselben Einfluß aus, wenn sie einmal aus einer Aktivitätsminderung durch interionische Kräfte, das andere Mal aus einer Konzentrationsänderung durch Bildung undissoziierter Salze herrührt?

2. Wie sehen die Veränderungen der H' - und OH' -Bindungskurve in einen oder anderen Falle im einzelnen aus?

Die Kenntnis dieser Verhältnisse ist für den Eiweißchemiker aus experimentellen Gründen wichtig. Bisher² konnte man im allgemeinen die aktive Normalkonzentration³ von Eiweißsalzen nur für Proteinchloride unter bestimmten Bedingungen mit einiger Genauigkeit unmittelbar messen. Wird nun z. B. die H' -Bindung durch Änderungen der Aktivität oder des Dissoziationsgrades der entstehenden Eiweißsalze gesetzmäßig und übersehbar in praktisch feststellbarem Umfang geändert, so kann durch Vergleich der H' -Bindung aus Cl' -Lösungen und Lösungen anderer Anionen auch die aktive Normalkonzentration für die Eiweißsalze dieser anderen Anionen berechnet werden. Derartige Möglichkeiten wären für die Erklärung des Wirkungsmechanismus der Hofmeisterreihen vielleicht von Belang.

Die Veränderung der H' - bzw. OH' -Bindungskurve mehrwertiger Elektrolyte soll für Änderungen der Aktivität der entstehenden Ionen durch interionische Kräfte und für Änderungen der Ionenkonzentration infolge Bildung undissoziierter Salz-moleküle gesondert besprochen werden. Die Untersuchung geschieht an dem Beispiel des Normalitätsrestes einer n -wertigen schwachen Säure. Um sie mit einiger Klarheit und Sicherheit ausführen zu können, ist eine engere Definition einiger im vorigen Kapitel eingeführten Größen nötig.

¹ L. Michaelis, a. a. O., S. 115 und 125.

² Doch vgl. dazu P. Rona und H. H. Weber, „Über die aktive Normalkonzentration einiger Myogensäuresalze“, erscheint später in dieser Zeitschrift.

³ Der Ausdruck Normalkonzentration wird hier angewandt, weil sich bei Proteinen ja alle experimentellen Aussagen unmittelbar nur auf Valenzen und nicht auf Moleküle beziehen. Man mißt in Wirklichkeit ja nur, welcher Bruchteil der Gegenionen (z. B. der Cl' bei Proteinchloriden) in chemisch reaktionsfähigem (aktivem) Zustande vorliegt. Ein Cl' z. B. ist aber nur das Gegenion einer Valenz des Proteinmoleküls. Zu dem ganzen Molekül werden meist viele Cl' als Gegenionen gehören.

A = Molare Konzentration der Moleküle, die noch kein H^+ abdissoziiert haben.

A' = Molare Konzentration der Moleküle, die ein H^+ abdissoziiert haben.

A'' = Molare Konzentration der Moleküle, die zwei H^+ abdissoziiert haben, usw.

Diese Definitionen gelten ohne Rücksicht darauf, ob durch die H^+ -Abdissoziation Anionen mit freier elektrischer Ladung oder infolge sekundärer Addition eines Basenrestkations undissoziierte Salzmoleküle entstanden sind — und ohne Rücksicht darauf, ob die Säuremoleküle und die verschiedenen Ionen ganz oder nur teilweise aktiv sind.

Es soll zunächst der Einfluß eines gegebenen Aktivitätsfaktors (f_a), also einer gegebenen Abweichung der Aktivität vom Wert 1, auf die Normalitätsrestkurve ($\bar{\varrho}$) festgestellt werden unter der Annahme, daß sich keine undissoziierten Salzmoleküle bilden.

In Massenwirkungsgleichungen geht nur der aktive Bruchteil jedes Reaktionsteilnehmers ein, also statt A nur $f_{a_0} \cdot A$, statt A' nur $f_{a_1} \cdot A'$, statt A'' nur $f_{a_2} \cdot A''$ usw., wo f_{a_0} , f_{a_1} , f_{a_2} die Aktivitätsfaktoren der Säuremoleküle der einwertigen, zweiwertigen usw. Ionen sind. Die unter (2) gegebenen Werte für A' , A'' usw., d. h. die Werte für die Gesamtkonzentration der Teilchen, die ein, zwei usw. H^+ abdissoziiert haben, werden dann modifiziert, wie folgt:

$$\left. \begin{aligned} f_{a_1} \cdot A' &= \frac{f_{a_0} \cdot A \cdot K_1}{h}, & A' &= \frac{f_{a_0} \cdot A \cdot K_1}{h f_{a_1}}, \\ f_{a_2} \cdot A'' &= \frac{f_{a_1} \cdot A' \cdot K_2}{h} = \frac{f_{a_0} \cdot A \cdot K_1 \cdot K_2}{h^2}, & A'' &= \frac{f_{a_0} \cdot A \cdot K_1 \cdot K_2}{h^2 \cdot f_{a_2}}, \\ A''' &= \frac{f_{a_0} \cdot A \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot K_3}{h^3 \cdot f_{a_3}} \text{ usw.} \end{aligned} \right\} \quad (8)$$

Setzt man die so erhaltenen Werte in die Formel (3) ein, so ergibt sich

$$\bar{\varrho} = \frac{1 + \frac{n-1}{n} \frac{f_{a_0} K_1}{h \cdot f_{a_1}} + \frac{n-2}{n} \frac{f_{a_0} \cdot K_1 K_2}{h^2 f_{a_2}} + \dots \frac{n-n}{n} \frac{f_{a_0} \cdot K_1 \dots K_n}{h^n \cdot f_{a_n}}}{1 + \frac{f_{a_0} K_1}{h \cdot f_{a_1}} + \frac{f_{a_0} \cdot K_1 \cdot K_2}{h^2 \cdot f_{a_2}} + \dots \frac{f_{a_0} \cdot K_1 \dots K_n}{h^n \cdot f_{a_n}}}$$

oder

$$\bar{\varrho} = \frac{\frac{1}{f_{a_0}} + \frac{n-1}{n} \frac{K_1}{h f_{a_1}} + \frac{n-2}{n} \frac{K_1 K_2}{h^2 f_{a_2}} + \dots \frac{n-n}{n} \frac{K_1 \dots K_n}{h^n f_{a_n}}}{\frac{1}{f_{a_0}} + \frac{K_1}{h \cdot f_{a_1}} + \frac{K_1 K_2}{h^2 \cdot f_{a_2}} + \dots \frac{K_1 \dots K_n}{h^n f_{a_n}}} \quad (9)$$

Betrachten wir diese Formel darauf, wie sich die $\bar{\varrho}$ -Kurve ändert, wenn sich die Aktivitätsfaktoren ändern, z. B. einen von 1 abweichenden

Wert annehmen, so ergibt sich: Sind alle f_a -Werte von $f_{a_0} - f_{a_n}$ gleich, so heben sie sich aus der Formel heraus. Die $\bar{\varphi}$ -Kurve bleibt für jeden Wert des Aktivitätsfaktors unverändert. Aktivitätsverschiedenheiten einer schwachen Säure etwa bei Gegenwart verschiedener Neutralsalze sind aus der $\bar{\varphi}$ -Kurve überhaupt nicht abzulesen, falls diese Aktivitätsverschiedenheit Ionen und Moleküle gleichmäßig betrifft. Das aber ist bei einwertigen Elektrolyten ebenso. Die eingangs erwähnte Verschiebung ihrer Dissoziationskurve beruht darauf, daß je nach dem Milieu sich zwar die Aktivität der Ionen ändert, aber nicht die der Moleküle, oder, was auf dasselbe herauskommt, daß die der Ionen sich stärker ändert als die der Moleküle.

Wie sieht also die Normalitätsrestkurve eines mehrwertigen Elektrolyten aus, wenn seine Moleküle den Aktivitätsfaktor 1 behalten, seine Ionen aber einen davon abweichenden, für alle Ionenarten (A' , A'' usw.) gleichen Wert von f_a annehmen? Dann lautet Gleichung (9)

$$\bar{\varphi} = \frac{1 + \frac{n-1}{n} \frac{K_1}{hf_a} + \frac{n-2}{n} \frac{K_1 K_2}{h^2 f_a^2} + \dots + \frac{n-n}{n} \frac{K_1 \dots K_n}{h^n f_a^n}}{1 + \frac{K_1}{hf_a} + \frac{K_1 K_2}{h^2 f_a^2} + \dots + \frac{K_1 \dots K_n}{h^n f_a^n}}. \quad (10)$$

Hier tritt f_a in allen Gliedern gemeinsam mit K_1 , und zwar als antipate Größe auf. Jede Änderung von f_a wirkt also wie eine proportionale Änderung von K_1 in entgegengesetztem Sinne. Änderungen von K_1 beeinflussen die $\bar{\varphi}$ -Kurve aber nur in dem Teile, der durch die Dissoziation der ersten Valenz bestimmt ist, also in einem um so kleineren Bereich ihres Verlaufs, je vielwertiger der Elektrolyt ist und je weiter seine Dissoziationskonstanten auseinanderliegen. Das gleiche gilt somit für gleichmäßige Änderungen der ionalen Aktivitätsfaktoren (von $f_{a_1} - f_{a_n}$).

Dies wird durch Abb. 1 für eine zweiwertige Säure illustriert: Liegen die beiden Dissoziationskonstanten weitauseinander ($K_1 = 10^{-7}$, $K_2 = 10^{-10}$), so macht sich eine Erniedrigung des ionalen Aktivitätsfaktors von 1 auf 0,5 für einen $\bar{\varphi}$ -Wert $< 0,5$ überhaupt nicht mehr geltend. Im Bereich der ersten Dissoziationsstufe dagegen tritt die durch die Halbierung des f_a be-

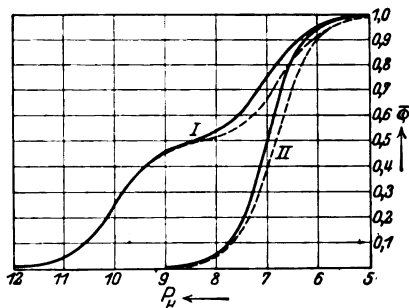


Abb. 1.

Aktivitätsfaktoren und Normalitätsrestkurve.

I. Kurvenpaar mit den Dissoziationskonstanten $K_1 = 10^{-7}$, $K_2 = 10^{-10}$.

— $f_{a_0} = f_{a_1} = f_{a_2} = 1$,

--- $f_{a_0} = 1$, $f_{a_1} = f_{a_2} = 0,5$.

II. Ebenso mit Dissoziationskonstanten $K_1 = K_2 = 10^{-7}$.

dingte scheinbare Verdoppelung von K_1 voll in Erscheinung: Die $\bar{\varrho}$ -Kurve ist für $\bar{\varrho}$ -Werte $> 0,5$ um $0,3 (= \log 2)$ im p_H verschoben. Ist dagegen $K_1 = K_2$, so daß sich die Dissoziation der ersten Stufe über die ganze Normalitätsrestkurve erstreckt, so verwischen sich diese Verhältnisse. Die ganze Normalitätsrestkurve wird verschoben (aber auch hier nicht parallel), doch erreicht die Verschiebung dafür nirgends den Betrag von $0,3$ im p_H .

Eine Änderung des ionalen Aktivitätsfaktors bei unveränderter Aktivität der Moleküle ist also nur in dem Teil der $\bar{\varrho}$ -Kurve erkennbar, dessen Gestalt durch die Dissoziation der ersten Valenz bestimmt ist, falls sich die Aktivitätsfaktoren für alle Ionenarten des mehrwertigen Elektrolyten ($f_{a_1} - f_{a_n}$) gleichmäßig ändern. Bei vielwertigen Elektrolyten ist diese Aktivitätsänderung in dem größten Teile der $\bar{\varrho}$ -Kurve überhaupt nicht abzulesen, ganz gleich, wie groß die auftretenden Änderungen der ionalen Aktivität sind.

Eine Verlagerung der $\bar{\varrho}$ -Kurve in ihrem ganzen Verlauf tritt überhaupt nur dann auf, wenn die Aktivitätsfaktoren der einzelnen Ionenarten sich ungleichmäßig ändern, und zwar wenn diese Änderung mit steigender Wertigkeit des Ions immer größer wird ($\Delta f_{a_1} < \Delta f_{a_2} < \Delta f_{a_3}$ usw.). Dies geht aus folgender Betrachtung hervor: Eine Verschiebung der $\bar{\varrho}$ -Kurve hat dann stattgefunden, wenn nach der Verschiebung derselbe Normalitätsrest ($\bar{\varrho}$ -Wert) einer anderen $[H]$ (einem anderen p_H) zugeordnet ist wie vorher. Der formal besonders markante Fall einer Parallelverschiebung ist dann gegeben, wenn die p_H -Differenz infolge der Verschiebung für alle $\bar{\varrho}$ -Werte dieselbe ist.

Der $\bar{\varrho}$ -Wert bleibt unverändert, wenn in Gleichung (9) die Produkte $f_{a_1} \cdot h, f_{a_2} \cdot h^2, f_{a_3} \cdot h^3$ usw. trotz Veränderung von h dieselben bleiben, wenn also $f_{a_1}, f_{a_2}, f_{a_3}$ usw. um ebensoviel z. B. kleiner werden als h, h^2, h^3 usw. größer wird. Bezeichnen wir den veränderten h -Wert als h' und die veränderten f_a -Werte als f'_a -Werte, so folgt aus dieser Bedingung:

$$\left. \begin{aligned} \frac{f'_{a_1}}{f_{a_1}} &= \frac{h}{h'}, \\ \frac{f'_{a_2}}{f_{a_2}} &= \frac{h^2}{h'^2} = \frac{f'^2_{a_1}}{f^2_{a_1}}, \\ \frac{f'_{a_n}}{f_{a_n}} &= \frac{h^n}{h'^n} = \frac{f'^n_{a_1}}{f^n_{a_1}} \end{aligned} \right\} \quad (11)$$

$\frac{f'_a}{f_a}$ ändert sich also mit wachsender Wertigkeit des Ions sehr stark.

Wird aus $f_{a_1} = 1$ etwa durch Hinzufügen eines Neutralsalzes $f'_{a_1} = 0,79$, so muß aus $f_{a_{10}} = 1, f'_{a_{10}} = (0,79)^{10} = 0,1$ werden, damit eine Parallel-

verschiebung der $\bar{p}$ -Kurve auftritt. Eine Verkleinerung des f_{a_1} von 1 auf 0,79 entspricht aber einer Erhöhung der h von 1 auf 1,26, da nach (11) $\frac{0,79}{1} = \frac{1}{1,26}$ ist.

Diese h -Veränderung bedeutet nur 0,1 im p_H . Damit eine so geringe Parallelverschiebung der $\bar{p} - p_H$ -Kurve auftritt, müssen sich also die Aktivitätsfaktoren der hochwertigen Ionen selbst im günstigsten Falle (vgl. dazu S. 392) ganz außerordentlich ändern (z. B. $f_{a_{10}}$ von 1 auf 0,1).

Zusammenfassend läßt sich sagen: Im allgemeinen wird der Einfluß gegebener ionaler Aktivitätsänderungen auf die $\bar{p}$ -Kurve bei der Dissoziation höherer Valenzen so gering, daß selbst beträchtliche Aktivitätsänderungen in diesem Teil der Normalitätskurve aus ihrer Verlagerung nicht einmal qualitativ feststellbar sein werden. Dieses gilt besonders für Proteine mit ihrer hohen Wertigkeit. Findet man dagegen doch Veränderungen der $\bar{p}$ -Kurve, etwa bei Wechsel des Neutralsalzmilieus, so ist nach den voranstehenden Ausführungen ihre quantitative Ausdeutung als Aktivitätsänderung meist nicht möglich. Sie erfordert nämlich die Kenntnis aller Dissoziationskonstanten des betreffenden Elektrolyten und des veränderten und unveränderten Normalitätskurvenverlaufs. Dieses aber sind Größen, die ohne molekulartheoretische Erwägungen¹ bei Eiweißkörpern bisher nicht zur Verfügung stehen.

Die Bildung undissoziierter Salze muß die H^+ - und OH^- -Bindungskurve mehrwertiger Säuren und Basen (im Gegensatz zu den Verhältnissen bei einwertigen Elektrolyten) anders beeinflussen als Aktivitätsänderungen. Ein nicht aktives Ion nimmt an keiner chemischen Reaktion teil, kann also auch nicht unmittelbar in den Zustand höherer Wertigkeit übergehen. Dagegen kann ein Ion, das in einer bestimmten Valenz ein undissoziiertes Salz gebildet hat, selbstverständlich in den höheren Valenzen weitere H^+ abdissoziieren. Für die Aufstellung einer Normalitätsrestformel unter Berücksichtigung dieser Tatsache sind einige neue Begriffe einzuführen. Werden die molaren Gesamtkonzentrationen aller Moleküle, die ein oder mehrere H^+ abdissoziiert haben, weiterhin mit A' , A'' , A''' usw. bezeichnet, so ist ferner:

1. a' , a'' , a''' usw. der Bruchteil von A' , A'' , A''' usw., welcher ein Ion mit freier Ladung bleibt.

2. as' , as'' , as''' usw. der Bruchteil von A' , A'' , A''' usw., der in der ersten Valenz ein undissoziiertes Salz bildet.

3. ass''' , ass'''' , ass''''' usw. der Bruchteil der hierfür in Frage kommenden Wertigkeitsstufen (A'' , A''' , A'''' usw.), der in den ersten beiden Valenzen ein undissoziiertes Salz bildet, analog $asss''''''$, $asss'''''''$, $asss''''''''$ usw.

¹ Vgl. *Linderström-Lang und Ellen Lund*, a. a. O.

Ferner ist

$$\left. \begin{aligned} \alpha_1 &= \frac{a'}{a' + as''}, \\ \alpha_2 &= \frac{as'''}{as''' + asss''''}, \\ \alpha_3 &= \frac{asss''''}{asss'''' + asssss'''''} \text{ usw.} \end{aligned} \right\} \quad (12)$$

Nun scheinen auf den ersten Blick die Verhältnisse sehr unübersichtlich, da alle diese zahlreichen Existenzformen des Elektrolyten ineinander übergehen können. Zwischen dem einwertigen Ion mit freier Ladung (a') und seinem Salz (as'') und dem zweiwertigen Ion (a'') und seinen Salzen (as''' und $asss''''$) bestehen bereits folgende Gleichgewichte:

$$\left. \begin{aligned} \text{a) } a'' &= \frac{a' K_2}{h}, & \text{b) } as'' &= \frac{a' \cdot s}{K_{1S}}, \\ \text{c) } as''' &= \frac{a'' \cdot s}{K_{2S}}, & \text{d) } as''' &= \frac{K'_2 \cdot as''}{h}, & \text{e) } asss'''' &= \frac{as''' \cdot s}{K_{2SS}}, \end{aligned} \right\} \quad (13)$$

worin die K -Werte die verschiedenen Dissoziationskonstanten dieser fünf Gleichgewichte bedeuten. s ist die molare Konzentration des einwertigen Kations, mit dem die mehrwertige schwache Säure das undissoziierte Salz bildet. Sie soll in den weiteren Betrachtungen als konstant angenommen werden, was bei Überschuß eines Neutralsalzes praktisch realisiert ist. Nun ergibt die genauere Betrachtung, daß sich diese fünf Gleichgewichtsbedingungen für die Charakterisierung des jeweiligen Zustandes des Elektrolyten teilweise gegenseitig vertreten. Kombiniert man nämlich die Gleichgewichtsformeln (13) a) bis d), so ergibt sich

$$K_2 \cdot \frac{K_{1S}}{K_{2S}} = K'_2. \quad (14)$$

Also ändert sich K'_2 proportional $\frac{K_{1S}}{K_{2S}}$. D. h., wird K_{1S} größer als K_{2S} , ist mit anderen Worten das Gleichgewicht zwischen den Ionen mit freier Ladung und den Ionen, die in der ersten Valenz ein undissoziiertes Salz bilden, im zweiwertigen Zustande des Elektrolyten mehr nach der Seite des Salzes verschoben als im einwertigen Zustande, so entspricht dem eine Vergrößerung von K'_2 . Man kann also diese Tatsache auch durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen as'' und as''' nach der Seite von as''' (entsprechend der Vergrößerung von K'_2) richtig beschreiben.

Das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Formen von A' und A'' ist also durch die Gleichungen a), d) und e) von (13) ausreichend charakterisiert. Die Tatsache, daß in jeder Wertigkeitsstufe undissoziierte Salzformen auftreten, die nicht aus den Salzformen

der vorhergegangenen Stufe unmittelbar durch H' -Abdissoziation entstehen, ist in unserem Beispiel durch Gleichung e) von (13) dargestellt. Man kann dieser Tatsache aber auch generell durch Einführung der Begriffe α_1, α_2 usw. [s. unter (12)] gerecht werden. α_1 würde dann in unserem Beispiel für die Berechnung von A' die Gleichung b) unter (13) vertreten, α_2 die Gleichung e) unter (13) bei der Berechnung von A'' . Dies hat den Vorteil, daß die α -Werte unmittelbar mit den f_a -Werten des vorigen Abschnittes vergleichbar sind: Beide Arten von Werten charakterisieren in der Normalitätsrestformel das Verhältnis der freien elektrischen Ladungen zur Gesamtheit der Valenzen, die ein H' abdissoziiert haben.

Die Formulierung von A', A'', A''' usw. in der ausgeführten Weise geschieht folgendermaßen:

$$\begin{aligned}
 A' &= a' + a s'; \quad a' = \alpha_1 A' = \frac{A K_1}{h}; \\
 A' &= \frac{A K_1}{h \alpha_1}; \quad a s' = (1 - \alpha_1) A' = \frac{A K_1}{h} \cdot \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1}; \\
 A'' &= a'' + a s'' + a s s''; \\
 a'' &= \frac{a' K_2}{h} = \frac{A K_1 K_2}{h^2}; \quad a s'' = \frac{a s' K_2'}{h} = \frac{A K_1 K_2'}{h^2} \cdot \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1}; \\
 a s s'' &= \frac{a s''}{\alpha_2} \cdot (1 - \alpha_2) = \frac{A K_1 K_2'}{h^2} \cdot \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1} \cdot \frac{1 - \alpha_2}{\alpha_2}; \\
 a s'' + a s s'' &= \frac{A K_1 K_2'}{h^2} \cdot \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1 \cdot \alpha_2}; \\
 A'' &= \frac{A K_1 K_2}{h^2} + \frac{A K_1 K_2'}{h^2} \cdot \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1 \cdot \alpha_2}; \\
 A''' &= a''' + a s''' + a s s''' + a s s s'''; \\
 a''' &= \frac{a'' K_3}{h} = \frac{A K_1 K_2 K_3}{h^3}; \\
 a s''' &= \frac{a s'' K_3'}{h} = \frac{A K_1 K_2' K_3'}{h^3} \cdot \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1}; \\
 a s s''' &= \frac{a s s'' \cdot K_3''}{h} = \frac{A K_1 K_2' K_3''}{h^3} \cdot \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1} \cdot \frac{1 - \alpha_2}{\alpha_2}; \\
 a s s s''' &= \frac{a s s s''}{\alpha_3} (1 - \alpha_3) = \frac{A K_1 K_2' K_3''}{h^3} \cdot \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1} \cdot \frac{1 - \alpha_2}{\alpha_2} \cdot \frac{1 - \alpha_3}{\alpha_3}; \\
 a s s s''' + a s s s s''' &= \frac{A K_1 K_2' K_3''}{h^3} \cdot \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1} \cdot \frac{1 - \alpha_2}{\alpha_2 \cdot \alpha_3}; \\
 A''' &= \frac{A K_1 K_2 K_3}{h^3} + \frac{A K_1 K_2' K_3'}{h^3} \cdot \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1} + \frac{A K_1 K_2' K_3''}{h^3} \cdot \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1} \cdot \frac{1 - \alpha_2}{\alpha_2} \cdot \frac{1 - \alpha_3}{\alpha_3} \text{ usw.}
 \end{aligned} \tag{15}$$

Wollte man diese Ausdrücke für A' , A'' usw. in dieser allgemeinen Form in die Normalitätsrestformel einsetzen, so würde diese sehr unübersichtlich.

Es ist darum zweckmäßig, folgende Annahme einzuführen: Der Dissoziationsgrad der Salzbildung in der ersten freien Valenz soll für alle Ionenarten der mehrwertigen schwachen Säure (a' , a'' , a''' usw.) gleich sein:

$$\frac{a'}{a' + as''} = \frac{a''}{a'' + as'''} = \frac{a'''}{a''' + as''''} \text{ usw.} = \alpha_1.$$

Er darf sich unterscheiden von dem Dissoziationsgrad der Salzbildung in der zweiten Valenz (α_2). Doch soll auch dieser wieder für alle für eine Salzbildung in der zweiten Valenz in Frage kommenden Ionenarten der Säure gleich sein:

$$\frac{as''}{as''' + as'''} = \frac{as'''}{as'''' + as''''} = \frac{as''''}{as''''' + as'''''} \text{ usw.} = \alpha_2.$$

Dieselben Bedingungen sollen auch für die Salzbildung in allen weiteren Valenzen gelten.

Nun wird nach (13) b) und c) $\frac{a'}{a' + as''} = \frac{a''}{a'' + as'''} = \frac{a'''}{a''' + as''''}$, wenn $K_{1s} = K_{2s}$ wird. Dies ist zu verallgemeinern. Auch K_{3s} , K_{4s} usw. wird gleich K_{1s} unter der oben eingeführten Annahme. Ebenso werden dann alle Dissoziationskonstanten der Salzbildung in der zweiten, dritten usw. Valenz in jeder Gruppe unter sich gleich.

Dann aber wird entsprechend (14) und den analog zu bildenden Gleichungen für alle anderen Salzdissoziationskonstanten

$$K_2 = K'_2, \quad K_3 = K'_3 = K''_3, \quad K_4 = K'_4 = K''_4 = K'''_4 \text{ usw.}$$

Hierdurch wird es möglich, in den Ausdrücken für A' , A'' , A''' usw. (s. S. 395) die jeweiligen Dissoziationskonstanten und h -Werte vor die Klammer zu ziehen. Setzt man die so erhaltenen Werte für A' , A'' , A''' usw. in die Normalitätsrestformel ein, so ergibt sich (nach Division von Zähler und Nenner durch A)

$$\varphi = \frac{1 + \frac{n-1}{n} \cdot \frac{K_1}{h} \cdot \frac{1}{\alpha_1} + \frac{n-2}{n} \cdot \frac{K_1 K_2}{h^2} \left(1 + \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1 \alpha_2}\right) + \frac{n-3}{n} \cdot \frac{K_1 K_2 K_3}{h^3} \left(1 + \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1} + \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1} \cdot \frac{1-\alpha_2}{\alpha_2 \alpha_3}\right)}{1 + \frac{K_1}{h} \cdot \frac{1}{\alpha_1} + \frac{K_1 K_2}{h^2} \left(1 + \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1 \alpha_2}\right) + \frac{K_1 K_2 K_3}{h^3} \left(1 + \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1} + \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1} \cdot \frac{1-\alpha_2}{\alpha_2 \alpha_3}\right)} + \dots$$

$$+ \dots \frac{\frac{n-n}{n} \cdot \frac{K_1 \dots K_n}{h^n} \left(1 + \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1} + \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1} \cdot \frac{1-\alpha_2}{\alpha_2} + \dots \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1} \cdot \frac{1-\alpha_2}{\alpha_2} \dots \frac{1-\alpha_{n-1}}{\alpha_{n-1} \alpha_n}\right)}{+ \dots \frac{K_1 \dots K_n}{h^n} \left(1 + \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1} + \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1} \cdot \frac{1-\alpha_2}{\alpha_2} + \dots \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1} \cdot \frac{1-\alpha_2}{\alpha_2} \dots \frac{1-\alpha_{n-1}}{\alpha_{n-1} \alpha_n}\right)} \quad (1)$$

Es soll nun zunächst in genauer Parallele zu den Untersuchungen über den Einfluß der f_a -Werte auf die Normalitätsrestkurve (s. S. 391) festgestellt werden, wie diese Kurve sich ändert, wenn aus $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_4$ usw. = 1, $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_4 = 0,5$ wird. Damit wird auch der mittlere Dissoziationsgrad = 0,5.

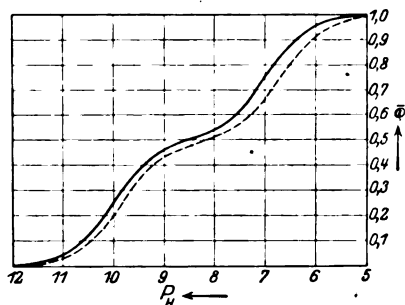


Abb. 2.

Die Bildung undissoziierter Salze und die Normalitätsrestkurve.

— Normalitätsrestkurve einer zweiwertigen Säure mit dem Dissoziationsgrad ihrer Salze $\alpha_1 = \alpha_2 = 1$, --- mit $\alpha_1 = \alpha_2 = 0,5$ ($K_1 = 10^{-7}$, $K_2 = K'_2 = 10^{-10}$).

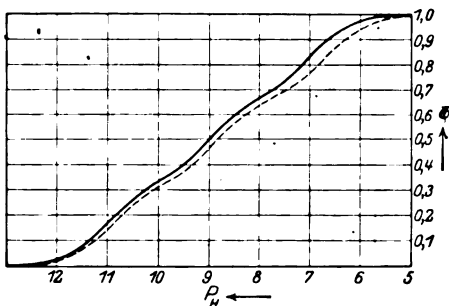


Abb. 3.

Die Bildung undissoziierter Salze und die Normalitätsrestkurve.

— Normalitätsrestkurve einer dreiwertigen Säure mit $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 1$, --- mit $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 0,5$ ($K_1 = 10^{-7}$, $K_2 = K'_2 = 10^{-9}$, $K_3 = K'_3 = K''_3 = 10^{-11}$).

Die Abb. 2 und 3 zeigen dies für eine zwei- und eine dreiwertige Säure mit den dort angegebenen Dissoziationskonstanten. Es ergibt sich, daß die Halbierung des mittleren Salzdissoziationsgrades die Normalitätsrestkurve im Bereich der H'-Abdissoziation der höheren Valenzen immer weniger verschiebt. Also ist der Einfluß eines gegebenen Salzdissoziationsgrades auf die Normalitätsrestkurve — ebenso wie der eines bestimmten Aktivitätsfaktors — bei mehrwertigen Säuren (und Basen) anders als bei einwertigen, und zwar geringer. Die Verschiebung der Normalitätsrestkurve mit der gleichmäßigen Änderung von α_1 , α_2 usw. nimmt im Bereich der H'-Abdissoziation der höheren

Valenzen aber weit langsamer ab als mit der analogen Änderung der f_a -Werte (vgl. dazu Abb. 1). Außerdem wird diese Verschiebung auch bei kleinem Normalitätsrest mit steigender Wertigkeit der Säure nie Null, sondern nähert sich asymptotisch einem Grenzwert. Die Größe dieses Grenzwertes hängt von dem Betrage der gleichmäßigen Erniedrigung von $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ usw. ab. Dieser untere Grenzwert der p_H -Verschiebung der Normalitätsrestkurve wächst sehr stark mit der zunehmenden gleichmäßigen Verkleinerung der α -Werte an. Werden diese gleichmäßig von 1 auf 0,5 herabgesetzt, so ist er noch so klein, daß die Verschiebung der Normalitätsrestkurve im Bereich der H^+ -Abdissoziation der höheren (z. B. der zehnten) Valenzen praktisch nicht mehr meßbar ist. Bei einer gleichmäßigen Herabsetzung der α -Werte von 1 auf 0,33 beträgt der untere Grenzwert der Verschiebung der Normalitätsrestkurve dagegen bereits 0,3 im p_H . Der in verschiedenartigem Salzmilieu bei Eiweißgegenwart vielleicht noch eben sicher zu wertende p_H -Unterschied von 0,1 stellt den unteren Grenzwert dieser Verschiebung dar, wenn die α -Werte gleichmäßig von 1 auf etwa 0,45 herabgesetzt werden. Diese verschiedenen rechnerischen Konsequenzen der obigen Überlegungen sollen hier nicht im einzelnen abgeleitet werden.

Damit die Normalitätsrestkurve sich mit einer Veränderung der α -Werte parallel verschiebt, müssen sich diese ungleichmäßig ändern. Auf S. 392 ist gezeigt, daß eine Parallelverschiebung der Normalitätsrestkurve das exponentiale Anwachsen der Faktoren zur Voraussetzung hat, mit denen die Werte für $\alpha', \alpha'', \alpha'''$ usw. zu multiplizieren sind.

Da der Faktor für $\alpha' = \frac{K_1 \alpha}{h}$ nach (16) $\frac{1}{\alpha_1}$ ist, muß also

$$\left. \begin{array}{l} \text{a) } 1 + \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1 \alpha_2} = \frac{1}{\alpha_1^2} \\ \text{b) } 1 + \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1} + \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1} \cdot \frac{1 - \alpha_2}{\alpha_2 \alpha_3} = \frac{1}{\alpha_1^3} \text{ usw.} \end{array} \right\} \quad (17)$$

sein.

Die Auflösung von (17) a) nach α_2 lautet:

$$\alpha_2 = \frac{\frac{1}{\alpha_1} - 1}{\frac{1}{\alpha_1^2} - 1}$$

Die Auflösung von b) nach α_3 lautet:

$$\alpha_3 = \frac{(1 - \alpha_1)(1 - \alpha_2)}{\alpha_2 \left(\frac{1}{\alpha_1^2} - 1 \right)}$$

Dieses Resultat vereinfacht sich zunächst nicht weiter, setzt man

aber für α_2 den eben abgeleiteten Wert $\frac{\frac{1}{\alpha_1} - 1}{\frac{1}{\alpha_1^2} - 1}$ ein, so wird daraus:

$$\alpha_3 = \frac{\frac{1}{\alpha_1} - 1}{\frac{1}{\alpha_1^2} - 1} = \alpha_2.$$

Bei analoger Behandlung wird auch α_4, α_5 usw. gleich α_2 , d. h., die Normalitätsrestkurve wird durch undissoziierte Salzbildung parallel verschoben, falls

$$\alpha_n = \alpha_{n-1} = \dots \alpha_3 = \alpha_2 = \frac{\frac{1}{\alpha_1} - 1}{\frac{1}{\alpha_1^2} - 1}$$

ist.

Falls also nur die beiden ersten α -Werte (α_1 und α_2) sich in der angegebenen Weise unterscheiden, sind alle übrigen α -Werte einander gleich (bei einer Parallelverschiebung der Normalitätsrestkurve).

Dies Resultat ist befremdend und schwer anschaulich zu begründen. Es läßt sich auf einem ganz anderen Wege bestätigen. Doch soll hier davon abgesehen werden, da heute die Konstanten für eine genaue Analyse der H^+ bzw. OH^- -Bindungskurven vielwertiger Elektrolyte in der hier angedeuteten Weise fehlen.

Zusammenfassend läßt sich sagen: Eine Änderung der α -Werte wirkt auf die Lage der Normalitätsrestkurve anders als eine Änderung der f_a -Werte. Bei gleichmäßiger Änderung der α -Werte (von α_1 bis α_n) wird die Normalitätsrestkurve auch bei mehrwertigen Elektrolyten in einem viel weiteren Bereich ihres Verlaufs verschoben als bei analoger Änderung der f_a -Werte. Wenn diese Verschiebung auch für einen kleinen Normalitätsrest bei hoher Wertigkeit des Elektrolyten kleiner wird, so wird sie doch theoretisch nie Null, sondern strebt einem Grenzwert zu. Dieser Grenzwert der Verschiebung ist praktisch meßbar, wenn die Änderung der α -Werte von 1 auf etwa 0,4 oder einen kleineren Wert erfolgt. Solche Änderungen — etwa durch Wechsel des Neutralsalzmilieus — können also auch bei einer ∞ -wertigen schwachen Säure (oder Base, vgl. dazu S. 387) dem qualitativen Nachweis aus der Änderung der Normalitätsrestkurve nicht entgehen. Für eine etwaige quantitative Berechnung gilt das für den f_a -Einfluß (S. 393) Gesagte.

IV. Der isoelektrische Punkt bei „wahrer“ Salzbildung.

Die schwerwiegendsten Bedenken gegen die Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes bei der Reaktion von Eiweißkörpern und verwandten Kolloiden mit anorganischen Ionen ergeben sich aus den Betrachtungen von *L. Michaelis* über die Lage des isoelektrischen Punktes¹. Dieser Autor hat nämlich abgeleitet, daß das p_H des isoelektrischen Punktes unverändert bleiben müßte, auch wenn das Kolloid nach dem Massenwirkungsgesetz undissoziierte Salze bildet. Nun ändert sich aber der Umschlagspunkt der kataphoretischen Wanderung mit Wechsel des Salzmilieus häufig. Dies gilt nicht nur für ganze Zellen, sondern auch für reine Eiweißkörper (*Jaques Loeb*², *H. H. Weber*³). Dieser Widerspruch hat zu dem Schluß Veranlassung gegeben, daß sich die Ionen des Neutralsalzes mit dem Protein nicht im Sinne des Massenwirkungsgesetzes verbinden, sondern daß sie adsorbiert werden. Dieser Schluß ist unberechtigt. Auch die Verschiebung des isoelektrischen Punktes widerspricht der Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes nicht.

Die Ableitung von *L. Michaelis*, auf der dieser Schluß beruht, wird nämlich den verwickelten Verhältnissen bei „wahrer“ Salzbildung eines Ampholyten nicht ganz gerecht. In seiner klassischen Formulierung des Ladungsgrades (λ) definiert *Michaelis* diesen als die molare Differenz der entgegengesetzt geladenen Ampholytteilchen im Verhältnis zur Gesamtmolarität des Ampholyten. Sind die Konzentrationen dieser entgegengesetzt geladenen Teilchen gleich, der Ladungsgrad also Null, so ist das definitionsgemäß der isoelektrische Zustand des Ampholyten. Nun nimmt *Michaelis* stillschweigend an, daß Ampholytteilchen mit freier elektrischer Ladung nur aus den undissoziierten Ampholytmolekülen entstehen könnten. Diese Annahme ist statthaft, falls der Ampholyt keine „wahren“ Salze bildet, und falls man Amphoionen (Zwitterionen) wie undissoziierte Moleküle ansieht. Dies ist bei Betrachtungen über den isoelektrischen Punkt berechtigt. Könnte man diese *Michaelis*sche Voraussetzung auch bei wahrer Salzbildung gelten lassen, so würde sich das oben angeführte Resultat ergeben: Der isoelektrische Punkt wird durch „wahre“ (undissoziierte) Salzbildung nicht in seiner Lage beeinflusst.

Nun heißt die Annahme über die Entstehung von Teilchen mit freier elektrischer Ladung in Wirklichkeit aber korrekt: Teilchen mit freier elektrischer Ladung können entstehen aus allen elektrisch neutralen Partikeln, die zur Abdissoziation eines H' oder OH' befähigt sind. Im Falle wahrer Salzbildung sind das aber außer den undisso-

¹ a. a. O., S. 124.

² *Jaques Loeb*, Die Eiweißkörper. Berlin, Julius Springer, 1924.

³ *H. H. Weber*, diese Zeitschr. 158, 451ff., 1925.

ziierten Ampholytmolekülen auch noch die in einer (entweder der basischen oder der sauren) Gruppe undissoziierten Salze. Vereintigt sich nämlich z. B. ein Ampholytkation mit einem Säurerestanion zu einem undissoziierten Salz, so wird es damit elektrisch neutral. Es besteht nun kein Grund, anzunehmen, daß ein solches Ampholytmolekül, das in seiner basischen Gruppe durch einen Säurerest besetzt ist, nicht in seiner sauren Gruppe ein H' abdissoziieren und damit eine negative Ladung aufnehmen kann.

Eine Ableitung unter Berücksichtigung dieser Tatsache bedarf folgender Begriffe:

- a = Molarität undissoziierter Ampholytmoleküle,
 a' = „ der Ampholytmoleküle, die ein H' abdissoziiert haben,
 as = „ des „wahren“ elektroneutralen (undissoziierten) Salzes des Ampholytanions (a'),
 as' = „ des „wahren“ Salzes des Ampholytanions (as), das außerdem ein OH' abdissoziiert hat,
 a'' = „ der Ampholytmoleküle, die ein OH' abdissoziiert haben,
 sa = „ des „wahren“ elektroneutralen Salzes des Ampholytkations,
 sa' = „ des wahren Salzes des Ampholytkations (sa), das außerdem ein H' abdissoziiert hat,
 sas = „ des „wahren“ Anion-Kationsalzes des Ampholyten (entsprechend $sa' + s'$ oder $as' + s'$),
 A = „ der Summe aller dieser Existenzformen des Ampholyten.

Ferner

$$\alpha_A = \frac{a'}{a' + as}; \quad \alpha_B = \frac{a''}{a'' + sa}; \quad \alpha_{AB} = \frac{as'}{as' + sas}.$$

Nun gelten folgende Beziehungen zwischen diesen Existenzformen des ein-einwertigen Ampholyten:

$$\left. \begin{array}{ll} \text{a) } a' = \frac{K_a a}{h} & \text{b) } as = \frac{a' \cdot s'}{K_{as}}; \\ \text{c) } as' = \frac{K'_b \cdot as}{oh} = \frac{K'_b \cdot as \cdot h}{K_w} & \text{d) } sas = \frac{as' \cdot s'}{K'_{bs}}; \\ \text{e) } a'' = \frac{K_b a}{oh} = \frac{K_b a h}{K_w} & \text{f) } sa = \frac{a' \cdot s'}{K_{bs}}; \\ \text{g) } sa' = \frac{K'_a sa}{h} & \text{h) } sas = \frac{sa' \cdot s'}{K'_{as}}, \end{array} \right\} \quad (18)$$

Die verschiedenen K -Werte bedeuten die Dissoziationskonstanten des betreffenden Gleichgewichts und K_w die Dissoziationskonstante des Wassers. Die Molekülform sas ist doppelt bestimmt durch (18) d) und h). Es wird also nur eine dieser beiden Gleichungen benötigt.

Findet nun ferner analog dem Verfahren des vorigen Abschnitts [siehe S. 395 (15)] die Charakterisierung der Salzbildung durch Einführung der α -Werte (α_A , α_B , α_{AB}) statt (anstatt durch s' , s' und K_{as} , K_{as} , K_{BS}), so sind die molaren Konzentrationen der einzelnen Existenzformen des Elektrolyten folgendermaßen festgelegt:

$$\left. \begin{aligned} a &= a; \\ a' &= \frac{a K_a}{h}; \\ as &= \frac{a K_a}{h} \cdot \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A}; \\ as' &= \frac{a K_a K'_b}{K_w} \cdot \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A}; \\ sas &= \frac{a K_a K'_b}{K_w} \cdot \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A} \cdot \frac{1 - \alpha_{AB}}{\alpha_{AB}}; \\ a' &= \frac{a K_b h}{K_w}; \\ sa &= \frac{a K_b h}{K_w} \cdot \frac{1 - \alpha_B}{\alpha_B}; \\ sa' &= \frac{a K'_a K_b}{K_w} \cdot \frac{1 - \alpha_B}{\alpha_B}. \end{aligned} \right\} \quad (19)$$

Der Ladungsgrad ist definitionsgemäß (s. S. 400)

$$\lambda = \frac{(a' + sa') - (a' + as')}{A}$$

oder

$$\lambda = \frac{a' + sa' - a' - as'}{a + a' + a' + sa + as + sa' + as' + sas}$$

und wird durch Einsetzen der molaren Konzentrationen der einzelnen Existenzformen des Ampholyten [s. unter (19)] als Funktion der h und der Dissoziationskonstanten zu folgender Formulierung:

$$\lambda = \frac{\frac{K_a}{h} + \frac{1}{K_w} \left(K'_a K_b \frac{1 - \alpha_B}{\alpha_B} \right)}{1 + \frac{K_a}{h} + \frac{K_b h}{K_w} + \frac{K_a}{h} \cdot \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A} + \frac{K_b h}{K_w} \cdot \frac{1 - \alpha_B}{\alpha_B} + \frac{1}{K_w} \left(K'_a K_b \frac{1 - \alpha_B}{\alpha_B} - K_a K'_b \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A} \right) - \frac{K_b h}{K_w}} \cdot \frac{1}{+ K_a K'_b \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A} + K_a K'_b \cdot \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A} \cdot \frac{1 - \alpha_{AB}}{\alpha_{AB}}} \quad (20)$$

Die h des isoelektrischen Punktes ist die h für den Ladungsgrad Null. Setze ich dementsprechend (20) $\lambda = 0$ und löse nach h auf, so ergibt sich

$$h_{I.P.} = \sqrt{\frac{K_a K_w}{K_b} + \frac{K_a^2}{4} \left(\frac{K'_a}{K_a} \cdot \frac{1 - \alpha_B}{\alpha_B} - \frac{K'_b}{K_b} \cdot \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A} \right)^2} + \frac{K_a}{2} \left(\frac{K'_a}{K_a} \cdot \frac{1 - \alpha_B}{\alpha_B} - \frac{K'_b}{K_b} \cdot \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A} \right). \quad (21)$$

Diese Formel für die h des isoelektrischen Punktes unterscheidet sich von der *Michaelis*-Formel durch Zusatzglieder, deren Vorzeichen und Betrag von dem Umfang der „wahren“ Salzbildung des Ampholyten abhängt. Findet eine solche nicht statt ($\alpha_A = \alpha_B = 1$), so werden diese Zusatzglieder Null ($\frac{1 - \alpha_B}{\alpha_B} = \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A} = 0$), und es bleibt die bekannte *Michaelis*formulierung

$$h_{I.P.} = \sqrt{\frac{K_a}{K_b} \cdot K_w}.$$

Über den Einfluß der Salzbildung ist folgendes zu sagen:

1. Er kann darin bestehen, daß K_a sich von K'_a und K_b sich von K'_b unterscheidet, d. h., daß die Fähigkeit der undissoziierten Ampholytsalze in den geladenen Zustand überzugehen [entsprechend Gleichung (18) c) und g)], anders ist als die der undissoziierten Moleküle. Wieweit das im gegebenen Einzelfall so ist, ist nicht mit Sicherheit vorherzusagen.

2. Muß die Salzbildung immer insofern auf die Lage des isoelektrischen Punktes einwirken, als sie die freie Ladung der betreffenden Valenz vernichtet, in der sich das undissoziierte Salz bildet. Art und Grad dieser Einwirkung ist vollständig zu übersehen.

Dies ist besonders leicht, wenn man annimmt, daß die Salzbildung in der zuerst angeführten Art keinen Einfluß hat, daß also K_a und K'_a sowie K_b und K'_b gleich sind. Dann wird (21) zu

$$h_{I.P.} = \sqrt{\frac{K_a K_w}{K_b} + \frac{K_a^2}{4} \left(\frac{1 - \alpha_B}{\alpha_B} - \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A} \right)^2} + \frac{K_a}{2} \left(\frac{1 - \alpha_B}{\alpha_B} - \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A} \right). \quad (22)$$

Es ergibt sich für diesen Fall:

1. Werden von dem Ampholyten die gleiche Anzahl an Säurerestanionen und Basenrestkationen gebunden, ist also $\alpha_B = \alpha_A$, so wird der Ausdruck $\left(\frac{1 - \alpha_B}{\alpha_B} - \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A} \right)$ Null. Die Lage des isoelektrischen Punktes bleibt unverändert.

2. Ist $\alpha_B < \alpha_A$, so wird dieser Ausdruck in der Klammer positiv. Der isoelektrische Punkt wird nach der sauren Seite verschoben. Dies wäre also in Übereinstimmung mit den experimentellen Befunden (vgl. S. 400) dann der Fall, wenn sich spezifisch besonders wirksame Säurerestanionen bevorzugt mit dem Ampholyten zu einem Salz verbinden.

3. Ist $\alpha_B > \alpha_A$, so wird der Klammerausdruck außerhalb des Wurzelzeichens negativ, unter der Wurzel bleibt er allerdings positiv, weil er dort als Quadrat auftritt. Der Gesamtwert der rechten Seite von (22) wird aber doch verkleinert, wovon man sich am einfachsten an einem Zahlenbeispiel überzeugen kann. Eine bevorzugte „wahre“ Bindung von Basenrestkationen bewirkt also eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes nach der alkalischen Seite.

4. Wird entweder α_B oder $\alpha_A = 0$, so wird

$$\frac{1 - \alpha_B}{\alpha_B} \text{ bzw. } \frac{1 - \alpha_A}{\alpha_A} = \infty,$$

d. h. der isoelektrische Punkt in der Richtung, die für die bevorzugte Verkleinerung dieser beiden Werte unter 2. und 3. angegeben ist, in die Unendlichkeit verschoben. Ein Ampholyt, dessen gesamte basische Valenzen durch undissoziierte Salzbildung besetzt sind, verhält sich also wie eine schwache Säure, sind dagegen seine gesamten sauren Valenzen besetzt, wie eine schwache Base. Dies Resultat ist ohne weiteres anschaulich.

5. Wird für ein bestimmtes Verhältnis $\frac{\alpha_A}{\alpha_B}$ der isoelektrische Punkt um einen bestimmten Betrag nach der sauren Seite verschoben, so wird er für das reziproke Verhältnis $\frac{\alpha_B}{\alpha_A}$ um denselben Betrag nach der alkalischen Seite verschoben.

6. Ein bestimmtes Verhältnis $\frac{\alpha_A}{\alpha_B}$ verschiebt den isoelektrischen Punkt um so mehr, je größer das Produkt $K_a \cdot K_b$ ist. Wird dies Produkt kleiner als 10^{-15} , so wird die Verschiebung schon recht klein. Für $K_a \cdot K_b = 10^{-18}$ muß $\frac{\alpha_A}{\alpha_B}$ schon gleich $0,01 \left(\frac{0,01}{1} \right)$ bzw. $100 \left(\frac{1}{0,01} \right)$ sein, um eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes um etwa 0,3 im p_H zu bewirken.

Nun ist aber bei Ampholyten von Aminosäuretypus überhaupt mit einem hohen Produkt $K_a \cdot K_b$ zu rechnen, entsprechend den

neueren Anschauungen über die Existenz eines beträchtlichen Bruchteils dieser Körper als Amphoionen (Zwitterionen). Ganz sicher aber dürfte das für Eiweißkörper gelten, bei denen ja sogar meistens das Produkt der „fiktiven“ (siehe S. 387) Konstanten nicht ganz niedrig ist, das Produkt $K_{a_1} \cdot K_{b_1}$ aber in Anbetracht ihrer Vielwertigkeit noch sehr viel (unter der Annahme eines als Säure wie als Base zehnwertigen Ampholyten 100mal) größer sein muß (vgl. dazu S. 387 über das Größenverhältnis der „wahren“ zu den „fiktiven“ Dissoziationskonstanten). Es ist also anzunehmen, daß die Erklärung der Verschiebung des isoelektrischen Punktes aus dem Massenwirkungsgesetz den Beobachtungen nicht nur dem Sinne, sondern auch dem Umfange nach genügt.

Zusammenfassung.

1. Die H^+ - bzw. OH^- -Bindungskurve mehrwertiger Säuren und Basen wird auf einen rationellen Maßstab gebracht durch Definition als Normalitätsrestkurve (Verhältnis der undissoziierten Normalität zur Gesamtnormalität). Die Normalitätsrestkurve wird dargestellt als Funktion der $[H]$ und der wahren Dissoziationskonstanten der einzelnen (ein-, zwei-, dreiwertigen) Ionenarten. Hierdurch ist die genaue (nicht näherungsweise) Errechnung dieser Dissoziationskonstanten aus der Elektrotitrationskurve von Säuren und Basen beliebiger Wertigkeit ermöglicht. Daß sich die Normalitätskurve sicher (Proteine, Hexosediphosphorsäure) oder wahrscheinlich (Fermentsubstratverbindungen) mehrwertiger Reaktionsteilnehmer durch eine sogenannte „mittlere“ Dissoziationskonstante darstellen läßt, läßt sich aus einem bestimmten Abstand ihrer „wahren“ Dissoziationskonstanten erklären. Für solche, den Verlauf der Normalitätskurve exakt beschreibende, aber nicht massenwirkungstheoretisch analysierende „mittlere“ Dissoziationskonstante wird der Ausdruck „fiktive“ Dissoziationskonstante vorgeschlagen.

2. Der Einfluß von Änderungen der ionalen Aktivität (f_a -Werte) auf die Normalitätsrestkurve mehrwertiger Elektrolyte wird analysiert (vgl. dazu den zusammenfassenden Absatz auf S. 393).

3. Der Einfluß von sekundären Änderungen der Ionenkonzentration von mehrwertigen Elektrolyten durch Bildung undissoziierter Salze (entsprechend dem Massenwirkungsgesetz) auf die Normalitätsrestkurve wird analysiert. Dieser Einfluß ist von dem ionaler Aktivitätsänderungen im Gegensatz zu den Verhältnissen bei einwertigen Elektrolyten nicht unwesentlich verschieden (vgl. dazu den zusammenfassenden Absatz auf S. 399).

4. Es wird gezeigt, daß die *Michaelissche* Ableitung, die Bildung „wahrer“ (undissoziierter) Salze eines Ampholyten beeinflusse die Lage seines isoelektrischen Punktes nicht, in dieser allgemeinen Form unrichtig ist. Es wird eine Formel für den isoelektrischen Punkt gegeben, die die Beeinflussung des isoelektrischen Punktes durch wahre Salzbildung zeigt und seine Verschiebung bei Kenntnis der verschiedenen Dissoziationskonstanten zu berechnen gestattet. Hiermit fügen sich auch die bei Proteinen und Proteinsystemen (Zellen) häufig beobachteten Verschiebungen des isoelektrischen Punktes durch Neutralsalze — zunächst qualitativ — einer Erklärung durch Massenwirkungsreaktionen.

Das kolloidale Verhalten der Muskeleiweißkörper.

III. Mitteilung:

Physikochemische Konstanten des Myogens¹.

Von

Hans H. Weber.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Rostock und der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 9. September 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Inhalt.	Seite
Allgemeiner Teil	407
I. Vorbemerkungen	408
II. Die Myogenlösung (Reinheit, spezifisches Gewicht, spezifische Drehung)	408
III. Fehlerquellen und Berechnungsweisen bei der Feststellung der H ⁺ - bzw. OH ⁻ -Bindungskurve	410
IV. H ⁺ - bzw. OH ⁻ -Bindungskurve und Äquivalentgewichte des Myogens	422
V. Über die aktive Normalkonzentration einiger Myogensalze	426
VI. Der „nichtlösende Raum“ für H ⁺ in Myogenlösungen	430
VII. Physiologische Folgerungen	433
Zusammenfassung	435
Experimenteller Teil	437
I. Myogendialysate	437
II. Die H ⁺ - und OH ⁻ -Bindung	440
III. Cl ⁻ -Messungen	448
IV. Viskositätsmessung	450

¹ Mit Unterstützung der Notgemeinschaft deutscher Wissenschaft.

Allgemeiner Teil.

I. Vorbemerkungen.

Der eigentliche Verkürzungsvorgang bei der Muskelkontraktion ist nur nach Kenntnis des physikochemischen Verhaltens der kontraktile Substanz zu erklären. Hierauf wurde bereits in der ersten Mitteilung¹ hingewiesen. Inzwischen erschienen neue Veröffentlichungen zur Frage nach dem Mechanismus der Kontraktion bestätigen diese Behauptung: *Garner*² diskutiert die Frage, wie weit der Verkürzungsvorgang als molekulare Umordnung der kontraktile Substanz beim Übergang von der flüssigen zur festen Kristallform zu verstehen sei. Er stützt sich hierbei auf gewisse Ergebnisse an Fettsäuren und ihren Seifen. Aber auch für den Muskel selbst wird die überschlagsweise Rechnung so durchgeführt, als ob Stearinsäure die kontraktile Substanz wäre. Diese Unterstellung war deshalb nicht zu vermeiden, weil für die hauptsächlichen Muskelfractionen alle in Frage kommenden Daten fehlen. Der *Garner*sche Ansatz erscheint an sich aussichtsreich, so sollen röntgenoskopisch bei der Kontraktionsform der Totenstarre die für feste (dagegen nicht für flüssige) Kristalle charakteristischen Interferenzen auftreten³, am frischen ruhenden Muskel aber fehlen.

Im folgenden werden eine Reihe Konstanten für das Myogen mitgeteilt. Da fast alle Kontraktionstheorien übereinstimmend dem Auftreten der H' eine entscheidende Bedeutung beimessen, ist besonderer Wert auf die Größen gelegt (Äquivalentgewicht scheinbare Dissoziationskonstanten), die die Reaktion des Myogens mit H' und OH' charakterisieren. Da die vorliegenden Mitteilungen notgedrungen aus systematischen Gründen nach kolloidchemischen Gesichtspunkten angeordnet sind, werden die etwaigen biologischen Konsequenzen der Ergebnisse am Schluß des allgemeinen Teils zusammen besprochen. Zur Säurequellentheorie kann dabei anscheinend abschließend Stellung genommen werden.

II. Die Myogenlösung.

Leitfähigkeit und $[H]$. Ein reines, geeignet hergestelltes Myogen-elektrodialysat⁴ hat eine spezifische Leitfähigkeit von 5 bis $15 \cdot 10^{-6}$. Ihr p_{aH} liegt meistens zwischen 6,6 und 6,0 (bisweilen bis 5,85)⁵.

Verunreinigungen. Es erweist sich damit als praktisch frei von anorganischen Elektrolyten. Infolge mehrtägiger bis mehrwöchiger

¹ H. H. Weber, diese Zeitschr. 158, 443, 1925.

² W. E. Garner, Proc. of the Roy. Soc. 99, 40, 1925.

³ Jonet H. Clark, Amer. Journ. of hyg. 6, 617, 1926; Ber. über d. ges. Phys. usw. 38, 344, 1927.

⁴ Z. B. H. H. Weber, l. c.

⁵ Durch die Ansäuerung des Dialyseaußenwassers, vgl. Weber, l. c.

Dialyse bei schwach saurer Reaktion in Abwesenheit von Salzen ist das Dialysat als myosinfrei anzusehen¹. Dagegen enthält es immer etwas Albumin. Nach Ausfällen des Myogens durch Erwärmen auf 70° zwischen p_{ah} 6 und 7 oder durch Sulfatfällung bei etwa p_{ah} 4 in 20 %iger Na_2SO_4 -Lösung findet sich in der Lösung noch ein kleiner Stickstoffbetrag, der 5 bis 10 % des ursprünglichen N-Gehaltes beträgt. Diese Werte dürften den maximalen Prozentsatz der Myogenverunreinigung durch Albumin darstellen.

Es kann bei den angegebenen Fällungsverfahren, bei denen Albumin sicher nicht in so verdünnter Lösung flockt, auch etwas Myogen gelöst bleiben. Außerdem zersetzt sich das offenbar sehr labile Myogen beim Erwärmen etwas, wodurch die Menge unkoagulabler Substanz vermehrt wird. Dies geht aus dem regelmäßigen, sehr beträchtlichen Anstieg der Leitfähigkeit auf das Doppelte bis Zehnfache, sowie gelegentlichen p_{ah} -Verschiebungen bis zu $\frac{1}{2}$ Zehnerpotenz nach der alkalischen Seite beim Erwärmen auf 70 bis 100° hervor. Nach Erwärmen auf 100° ist außerdem der Rest-N-Gehalt nicht geringer als nach Myogenfällung bei 70°. Die Beseitigung des Albuminstickstoffs wird anscheinend durch vermehrten Myogenzerfall ausgeglichen. Bei Enteiweißung mit Sulfosalicylsäure sinkt dagegen der N-Gehalt einer Myogenlösung unter 1 % des ursprünglichen Wertes.

Da die physikochemischen Konstanten genuiner Proteine ungefähr von gleicher Größenordnung sind, dürften die folgenden Ergebnisse durch die Abwesenheit der angegebenen, geringen Mengen von Fremdproteinen nicht wesentlich gefälscht sein (vgl. hierzu experimenteller Teil IA und B).

Myogenkonzentration. Die N-Konzentration eines Myogendialysats beträgt etwa 0,15 bis 0,6 Millimol N auf den Kubikzentimeter. Sie ist höher, wenn man von älteren Tieren mit derberer Muskulatur ausgeht, als wenn zarte Tiere verarbeitet werden. Sie nimmt während der Aufbewahrung durch Denaturierung durch Alterung langsam ab. Auf Grund der weitgehend übereinstimmenden Analysen von Fürth, Chumis und Chittenden² mit dem N-Faktor 6,15 auf Eiweiß umgerechnet bedeutet dieser N-Gehalt etwa 0,9 bis 5 %ige Myogenlösungen.

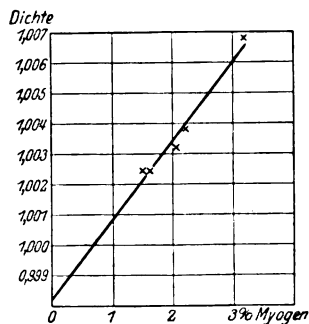


Abb. 1.
Dichte verschieden konzentrierter elektrolytfreier Myogenlösungen.

Spezifisches Gewicht. Das spezifische Gewicht frisch elektrodialysierter Lösungen ist bei 20° bis zu 3 % Myogengehalt geradlinig in der aus Abb. 1 ersichtlichen Weise von der Konzentration des Proteins

¹ Z. B. H. H. Weber, l. c.

² O. v. Fürth, Arch. f. d. exper. Pathol. u. Pharm. 36, 231, 1895.

abhängig. Die Gerade schneidet die Nulllinie (Ordinate) bei 0,99823, der Dichte reinen Wassers bei 20°. Aus dem spezifischen Gewicht der Lösung berechnet sich das spezifische Gewicht reinen (wasserfreien) Myogens zu 1,35 (1,31 bis 1,385) bei 20°, wenn man die Volumkonzentration bei der Lösung von Myogen vernachlässigt¹. Das Volumen eines Grammes dieses Proteins in Lösung beträgt somit 0,74 ccm (vgl. experimenteller Teil IC).

Spezifische Drehung. Die spezifische Drehung des Myogendialysats in der ersten Stunde nach der Elektrodialyse beträgt in 1 bis 3,5 %igen Lösungen 31,4 (32,8 bis 30,1) Grad ohne erkennbare Abhängigkeit von Konzentration und Vorgeschichte (z. B. Dialysedauer) nach Versuchen an Lösungen von sieben verschiedenen Kaninchen². Der p_H -Einfluß tritt in dem Intervall, das für ein Elektrodialysat in Frage kommt (6,6 bis 5,8), nicht deutlich hervor. Ein flaches Drehungsminimum scheint am isoelektrischen Punkt zu liegen. Dagegen beträgt die spezifische Drehung bei p_H 3,15 etwa 66°, bei p_H 3,02 etwa 73°. Bei p_H 3,15 beträgt der (dissoziierte) Normalitätsgrad³ etwa 0,75, bei 3,02 etwa 0,83. Unter der Annahme eines geradlinigen Anwachsens der spezifischen Drehung mit dem Normalitätsgrad berechnet sich also die Drehung des total dissoziierten Myogenkations zu etwa 78 bis 82°, also fast dreimal so groß wie die des Myogenmoleküls (vgl. experimenteller Teil ID).

III. Fehlerquellen und Berechnungsweisen bei der Feststellung der H^+ - bzw. OH^- -Bindungskurve.

Über die Fehler und Unsicherheiten, die bei der experimentellen und rechnerischen Festlegung der Elektrotitrationskurven von Proteinen auftreten können, liegt wenig Material vor. Die meisten Erwägungen dieser Art beschäftigen sich fast ausschließlich mit den aktivitätstheoretischen Problemen, die bei solchen Untersuchungen auftreten.

Die gebundene H^+ - bzw. OH^- -Menge wird dargestellt als Funktion des p_{aH} . Als p_{aH} wird der negative Exponent der H^+ -Aktivität (und nicht der H^+ -Konzentration) bezeichnet. p_{aH} ist damit eine ohne weitere

¹ Dieses spezifische Gewicht braucht selbstverständlich nicht dasselbe zu sein, wie das des getrockneten Myogens, da bei der Trocknung intramolekulare Umlagerungen (Denaturierung) vor sich gehen können.

² Der angegebene Wert gilt deshalb nur für frisch elektrodialysierte, hinterher vor CO_2 -Aufnahme geschützte Lösungen, weil nach *Pauli* bei CO_2 -Aufnahme von Proteinlösungen mit einer carbaminsäureartigen Umlagerung des Proteins zu rechnen ist. Diese müßte aber mit einer Drehungsänderung verbunden sein.

³ Vgl. über den Begriff Normalitätsgrad S. 423, Anm. 1.

theoretische Voraussetzungen über die Aktivität der H' experimentell bestimmbare Größe.

Fehler in der Darstellung dieser Funktion können durch folgende Faktoren entstehen:

1. Kann auch eine reine Proteinlösung durch Eiweißspaltung während des Versuches H' und OH' bindende Fremdstoffe bilden. Eine solche Eiweißspaltung kommt wohl ausschließlich bei extremem p_{a_h} durch H' oder OH' in Frage.
2. Durch Wahl eines falschen Aktivitätsfaktors für die Umrechnung des p_{a_h} auf C_H .
3. Durch Vernachlässigung des „nichtlösenden Raumes“ (*Polanyi*¹).
4. Durch Einstellung mizellarer Donnangleichgewichte.
5. Durch Fehler in der p_{a_h} -Messung.

Proteinhydrolyse durch Säure oder Alkali. Eine Aufspaltung des Eiweißes während des Versuches scheint nur in einem sehr kleinen p_{a_h} -Bereich in Frage zu kommen. Selbst eine stark salzsaure Myogenlösung (zwischen p_{a_h} 1 und 2) gibt während 36 Stunden durch eine Kollodiummembran höchstens Spuren dialysabler Substanzen ab (Biuret der Außenlösung ist immer negativ, die Bildung von xanthoproteinsäurem Ammonium ist fraglich bis ganz schwach positiv). — Dagegen ist nach *Waldschmidt-Leitz*² mit einer Alkalihydrolyse zu rechnen. Möglicherweise ist dieser Fehler recht hoch. Die maximale Laugenbindung eines Millimols Myogenstickstoff stellt sich nach der *Willstätter*-Methode nämlich um etwa 25 % niedriger als elektrotitrimetrisch. Bei der *Willstätter*-Methode kommt eine Laugenhydrolyse nicht in Frage, da die Bestimmung etwa 30 Sekunden erfordert. Es könnte also die Laugenbindungskurve bei sehr niedrigem p_{a_h} um etwa 25 % überhöht sein. Doch ist dies ein Maximalwert (vgl. experimenteller Teil IIC). Ohne Alkalihydrolyse, d. h. ohne Entstehung OH' -bindender Substanzen, würde die Eiweißlaugenmischung alkalischer sein, als sie es so ist. Unter den angewandten Versuchsbedingungen (s. S. 412 f.) entspricht dem angegebenen um 25 % zu hohen Betrag an gebundener Lauge ein etwa 25 bis 20 % zu niedriger freier Laugenanteil. Der p_{a_h} der Lösung erscheint also durch diesen Fehler um nur 0,1 bis 0,15 nach der sauren Seite verschoben. Die Bindungskurve ist demnach vielleicht nicht unwesentlich überhöht, aber nicht wesentlich deformiert.

Die anderen angeführten Fehler beeinflussen die Elektrotitrationskurve theoretisch in ihrem gesamten Verlauf. Mizellare Donnangleich-

¹ M. Polanyi, diese Zeitschr. 104, 237, 1920.

² E. Waldschmidt-Leitz, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 182, 181, 1924.

gewichte und Fehler in der p_{ah} -Bestimmung wirken ebenfalls sowohl auf das p_{ah} -Ergebnis wie auf die Berechnung der gebundenen H' und OH' . Einem Fehler in einer dieser beiden Größen entspricht aber ein ganz verschiedener Betrag des anderen Fehlers, je nach dem p_{ah} , um den es sich in dem betreffenden Ansatz handelt: Bei etwa neutraler Reaktion ändert ein sehr falscher Wert des p_{ah} den Betrag an gebundenem H' und OH' verschwindend wenig. Bei sehr extremem p_{ah} liegt es gerade umgekehrt (s. unten). Es soll deshalb im weiteren der Einfluß der angeführten Fehlerquellen auf die Bindungsgröße und den p_{ah} , bei dem diese Bindung stattfindet, gesondert besprochen werden. Das empfiehlt sich auch deshalb, weil die Wahl des Aktivitätsfaktors und die Berücksichtigung des „nichtlösenden Raumes“ ausschließlich für die Berechnung der Bindungsgrößen von Bedeutung sind.

A. Die Bestimmung der gebundenen H' bzw. OH' in Eiweißlösungen.

Die gebundene H' bzw. OH' -Menge berechnet sich als Differenz der Gesamtmenge des betreffenden Ions, die der Eiweißlösung zugeführt ist, und der Menge, die darin vorhanden ist. Die zugeführte H' -Menge ist unmittelbar gegeben. Wieviel in der Eiweißlösung vorhanden ist, kann unter bestimmten Bedingungen aus ihrem p_{ah} errechnet werden.

Die Abhängigkeit der Fehlergröße vom Verhältnis der freien zur gebundenen Säure bzw. Lauge: Etwaige Fehler bei der Berechnung der freien Säure und Lauge in dem Eiweißgemisch werden die Menge der gebundenen H' und OH' (der gebundenen Säure oder Lauge) um so weniger fälschen, je größer der gebundene Anteil der Säure oder Base ist. Absolut und relativ sehr klein ist der freie Anteil zwischen p_{ah} 3 und 11.

Er überschreitet in keinem Myogenansatz zwischen p_{ah} 4 und 10 2%, zwischen p_{ah} 3 und 11 5% der zugesetzten Säure oder Lauge. Ein Fehler in der Bestimmung seines Betrages ist für die Berechnung der gebundenen Säuremenge also praktisch belanglos. Außerhalb dieses p_{ah} -Bereiches läßt sich das Verhältnis des freien zum gebundenen Anteil verhältnismäßig günstig gestalten, wenn man die Proteinkonzentration des Ansatzes recht hoch hält (in dieser Arbeit oft über 3% Myogen, vgl. experimenteller Teil IIB, Tabelle VII bis X). Unter dieser Bedingung wächst auf der alkalischen Seite von p_{ah} 11 der Anteil der frei bleibenden Lauge an der insgesamt zugesetzten Base bis auf 42% für den alkalischsten Punkt, der überhaupt bestimmt wurde (p_{ah} 12,35). Selbst in diesem extremsten Falle wird ein Fehler in der Konzentration der freien Base bei der Umrechnung auf gebundenes OH' verkleinert. Der höchste Wert für das Verhältnis $\frac{\text{freibleibender Anteil}}{\text{zugesetzter Anteil}}$ findet sich in manchen extrem sauren

Ansätzen zwischen p_{ah} 1 und 2. Hier bleiben gelegentlich (experimenteller Teil IIB, Tabelle VII, Versuch Nr. 25 bis 26a) etwa zwei Drittel der zu-

gesetzten Säure frei, nur etwa ein Drittel wird vom Protein gebunden. Der Fehler in der Berechnung der freien Säuremenge wird also verdoppelt bei Errechnung des gebundenen Anteils.

Die angeführten Fehlerquellen können also irrige Angaben über den Betrag an gebundenem H' und OH' nur außerhalb des p_{ah} -Bereiches 3 bis 11 bewirken. Aber auch außerhalb dieses Bereiches wird ein Fehler in der Konzentration der freien Säure oder Lauge bei der Umrechnung auf den gebundenen Anteil in der vorliegenden Anordnung nie wesentlich hinaufmultipliziert. In vielen Arbeiten der Literatur ist das anders (vgl. Pauli¹).

Die Berechnung der freien Säure bzw. Lauge: Die Berechnung an freier Säure oder Lauge findet in folgender Weise statt: Mit Hilfe des Aktivitätskoeffizienten der betreffenden Säure oder Lauge wird p_{ah} in C_H bzw. C_{OH} umgerechnet. C_H (bzw. C_{OH}) ergeben durch Multiplikation mit dem Volumen, in dem die H' (OH') gelöst sind, die Menge an freier H' und OH' .

Der Einfluß des „nichtlösenden Raumes“ und des mizellaren Donnan-gleichgewichtes auf den Betrag an gebundenem H' und OH' : Dieses Volumen ist nicht das Volumen der Eiweißsäuremischung, sondern kleiner, und zwar mindestens um den Raumbetrag, den das Eiweiß selbst einnimmt, da sich im Protein keine Säure lösen kann. Dieser „nichtlösende Raum“ kann aber auch beträchtlich größer sein als das Eigenvolumen des Proteins, falls nämlich Eiweißmoleküle und besonders — nach Paulis Anschauungen — Eiweißionen einen großen Hydratationsmantel, einen Mantel reinen, also säurefreien Wassers mit sich tragen. Es muß deshalb bei diesen Rechnungen der „nichtlösende Raum“ berücksichtigt oder seine Bedeutungslosigkeit erwiesen werden. Auch der Fehler, der durch die etwaige Einstellung mizellarer Donnangleichgewichte bedingt ist, wirkt wie ein scheinbarer Zuwachs zu dem „nichtlösenden Raum“, der durch die anderen Faktoren bedingt ist. Da z. B. in saurer Lösung die $[H]$ in den Mizellen niedriger ist als in der übrigen Lösung, läßt sich das so ansehen, als wenn in einem Teil der Mizellen die normale $[H]$ wäre, in dem übrigen alle H' fehlten. Dies aber bedeutet in der Messung eine scheinbare Vergrößerung des „nichtlösenden Raumes“ für H' . Die für die H' -Bindung hier durchgeführten Betrachtungen gelten auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes analog für OH' .

Die gemessene Größe des „nichtlösenden Raumes“ ist bei extremem p_{ah} anscheinend sehr gering. Selbst bei maximaler Säureionisierung des Myogens (zwischen p_{ah} 1 und 2) scheint sie nur wenige Prozent des Gesamtvolumens zu betragen. Da in dieser Größe neben dem wahren

¹ W. Pauli und H. Wit, diese Zeitschr. 174, 308, 1926.

„nichtlösenden Raum“ auch der Donnanfehler enthalten ist, kann man diesen bei sehr saurem p_{ah} wohl als unwesentlich betrachten. Die Berücksichtigung des „nichtlösenden Raumes“ bei der Berechnung der freien Säuremenge erhöht den Betrag an gebundenem H^+ für das Millimol Myogenstickstoff um 10 % (vgl. experimenteller Teil II B, Tabelle VIIa), und zwar nur bei ganz extremem p_{ah} (saurer als 2). Er wurde deswegen im allgemeinen (z. B. Abb. 3) nicht berücksichtigt. Besonders da in extrem *alkalischen* Lösungen keine Bestimmung des „nichtlösenden Raumes“ vorgenommen wurde.

Einfluß des Aktivitätsfaktors (f_a) und des p_{ah} -Fehlers auf den Betrag an gebundenen H^+ und OH^+ : Zufällige Fehler der p_{ah} -Messung üben infolge ihrer Geringfügigkeit keinen wesentlichen Einfluß auf die Berechnung der gebundenen H^+ bzw. OH^+ aus. Dagegen scheinen systematische, für jede einzelne galvanische Anordnung charakteristische Fehler an der großen Unsicherheit bzw. des Aktivitätsfaktors (f_a) starker Säuren und Basen in mittleren Konzentrationen schuld zu sein. Diese Unsicherheit geht z. B. aus untenstehender Tabelle der f_a der meist untersuchten HCl in Abhängigkeit von ihrer Konzentration hervor.

Tabelle I.
Aktivität der HCl.

Autor	f_a für $c =$							Art der Kette
	2n	1n	0,1n	0,02n	0,01n	0,005n	0,001n	
Noyes und Mac Innes ¹	1,04	0,829	0,823	—	0,93	0,965	—	Pt H ₂ : HCl Ag Cl Ag
Pauli ² . . .	—	—	—	0,887	0,915	0,932	—	Gaskette mit Bjerrum-scher Extrapolation
Michaelis ³	1,378	1,164	1,031	1,02	1,034	—	0,967	a) Gaskette mit Bjerrum-scher Extrapolation b) Gaskette mit Zwischen-schaltung von HCl mit KCl gesättigt zwischen HCl und gesättigter KCl-Lösung

Es scheint, als wenn in den meisten galvanischen Anordnungen außer den eigentlichen Elektrodenpotentialen noch kleine andersartige elektromotorische Kräfte mitgemessen werden. Vielleicht sind das trotz der Eliminationsmaßnahmen (Bjerrumsche Extrapolation, Michaelis-Anordnung) Diffusionspotentiale. Da aber in einer bestimmten Apparatur die Meßergebnisse konstant und reproduzierbar sind (es

¹ Journ. Amer. Chem. Soc. **42**, 239, 1920.

² W. Pauli und H. Wit, diese Zeitschr. **174**, 308, 1926.

³ L. Michaelis und K. Kakinuma, ebendasselbst **141**, 394, 1924; L. Michaelis und A. Fujita, ebendasselbst **142**, 398, 1924.

wurden die *Michaelis*schen Daten für HCl mit einer diesem Verfasser genau nachgebildeten Apparatur vollkommen bestätigt), so ist die in der Unsicherheit des „wahren“ f_a liegende Schwierigkeit für den Biologen leicht vermeidbar: Er bestimmt in genau derselben Anordnung, die dem eigentlichen Versuch dient, den in seiner individuellen Versuchsanordnung geltenden „scheinbaren“ f_a und rechnet mit diesem. D. h. im Prinzip, er stellt an Lösungen bekannter Säure- oder Laugenkonzentration das Potential in seiner Apparatur fest. Findet er es dann in einer unbekannten Lösung desselben Elektrolyten wieder, so hat diese dieselbe Konzentration wie die Eichlösung. Hiermit ist gleichzeitig der Einfluß aller „systematischen“ Fehler der p_{ah} -Bestimmung auf die Berechnung der freien (und damit der gebundenen) H' und OH' ausgeschaltet.

Dies Verfahren stammt von *Jaqes Loeb*. Er sah zuerst als freie Säure in seinem Säureeiweißsystem diejenige Konzentration an Säure an, die nötig war, um reinem Wasser den p_{ah} der betreffenden Säureeiweißmischung zu erteilen, d. h. diejenige Konzentration an Säure, die bei Messung in derselben Anordnung (nur ohne Eiweiß) denselben elektromotorischen Effekt zeigte wie die Versuchslösung. Diese Säurekonzentration zog er dann von der zugesetzten Säure ab, um den vom Protein gebundenen Betrag zu erhalten. Er hat dies Verfahren allerdings nicht aktivitätstheoretisch begründet¹.

Die besprochene Methode setzt voraus, daß eine bestimmte Konzentration vom Protein nicht gebundener Säure oder Lauge bei Gegenwart eines Eiweißsalzes denselben p_{ah} (d. h. denselben elektromotorischen Effekt) zeigt wie in der Eichlösung ohne Eiweiß. Das ist nicht bewiesen.

Über die experimentell bisher nicht faßbare Beeinflussung der Säure- bzw. Laugenaktivität durch Eiweißsalze kann man theoretisch zurzeit nichts Sicheres aussagen. *Michaelis*² fand, daß Chloride verschiedener einwertiger Kationen je nach Konzentration und spezifischer Natur die Aktivität von HCl bald erhöhte, bald erniedrigte. *Pauli*³ gibt ferner an, daß 2- und 3wertige Kationen, die nach der *Debye-Hückels*chen Formel die HCl-Aktivität infolge ihrer höheren Wertigkeit vermehrt erniedrigen sollten, diese gar nicht beeinflussen. Es bleiben also nur zwei Kriterien dafür, wie sich der f_a von Lauge und Säure bei Proteinsalzgegenwart ändert. Erstens müssen die berechneten H' -

¹ Hierauf dürfte die heute übliche irrige Auffassung beruhen, *Jaqes Loeb* habe immer mit dem $f_a = 1$ gerechnet. In moderner Terminologie ergibt seine HCl-Elektrotitrationskurve in wässriger Lösung von $p_{ah} = 3$ an nach der sauren Seite sogar auffällig kleinere f_a als 1. (Vgl. *Jaqes Loeb*, Die Eiweißkörper, S. 49, Berlin, Julius Springer, 1924).

² *L. Michaelis*, l. c.

³ *W. Pauli* und *H. Wit*, l. c.

bzw. OH'-Bindungskurven „vernünftig“ sein, wenn der angewandte f_a als richtig gelten soll. Als vernünftig erscheint solche Kurve, wenn sie mit wachsender Säurekonzentration einem maximalen H'-Bindungswert zustrebt, der dann bei weiterer Säurevermehrung konstant bleibt. Das gleiche gilt für Laugenzusatz und OH'-Bindung. Dies Verhalten ist nach massenwirkungstheoretischen Erwägungen wie bei Annahme einer H'-Eiweiß-Adsorptionsbindung in derselben Weise zu fordern. Vernünftige Kurven in diesem Sinne bekommt man am besten, wenn man den f_a der freien Säure bzw. Lauge bei Anwesenheit und Abwesenheit von Protein gleichsetzt. Deshalb berechnet auch *Pauli*¹ neuerdings seine Versuche wieder so, als wenn kein Eiweißeinfluß auf die Aktivität der freien Säure bestünde.

Zweitens ergibt sich dieselbe maximale H'-Bindung durch ein Millimol Myogen in Lösungen verschiedener Proteinkonzentration. Mit der Proteinkonzentration ändert sich aber das Verhältnis der freien zur gebundenen Säure (von 1:3 bis 2:1), wird also ein konstanter Fehler in der Konzentration der freien Säure in ganz verschiedenem Umfang auf den gebundenen Anteil übertragen. Wenn trotzdem der gebundene Anteil überall gleich ist (vgl. experimenteller Teil IIB, Tabelle VII, Versuchsnummer 12, 19, 22 bis 26a), so spricht auch dies dafür, daß die freie [H] richtig ermittelt ist.

Der Aktivitätsfaktor kann bei dem angegebenen Verfahren nur so weit fehlerhaft sein, wie er sich infolge der Gegenwart von Eiweißsalz ändert. Die weitgehendste Annahme einer derartigen Änderung veranschlagt sie auf 0,2 gleich 20 %². Um soviel also könnte der Betrag an freier Säure zu niedrig berechnet sein. Da sich aber dieser Fehler selbst im ungünstigsten Fall bei ganz extremem p_{aH} nicht vergrößert auf den Betrag des gebundenen Anteils überträgt (s. S. 412 f.), stellt diese Größe auch den maximalen Fehler der H'-Bindung aus aktivitätstheoretischen Gründen dar. Dieser Fehler dürfte in Wirklichkeit viel kleiner sein³.

B. Die Bestimmung des p_{aH} .

Mizellare Donnangleichgewichte und Fehler in der Bestimmung fälschen den p_{aH} nicht in einer Weise, die Irrtümer in der Berechnung der gebundene H' und OH' veranlaßt. Trotzdem ist damit nicht gesagt, daß die gefundenen p_{aH} -Werte *absolut* richtig sind. Durch mizellare

¹ W. *Pauli* und H. *Wit*, l. c.

² L. *Reiner*, Kolloidzeitschr. 40, 327, 1926.

³ Nimmt man nämlich eine Erniedrigung des f_a der freien H' bzw. OH' um 0,2 infolge der Eiweißgegenwart an und berechnet so die gebundenen H' und OH', so wird die Bindungskurve „unvernünftig“, d. h. bei hohen Säure- und Laugenkonzentrationen (extremen p_{aH}) nimmt die Bindung wieder beträchtlich ab.

Donnangleichgewichte veranlaßte und zufällige p_{aH} -Fehler sind aus der Richtigkeit der Bindungsgröße nämlich nur für extreme p_{aH} -Werte auszuschließen, da die Bindungsgröße nur bei extremen p_{aH} -Werten (vgl. S. 412f.) von der Richtigkeit der p_{ah} -Angabe abhängt. Es bleibt also anzugeben, welchen Betrag solche Fehler bei mittleren p_{ah} erreichen. Die konstanten, in der Apparatur bedingten p_{ah} -Messungsfehler sind durch das geschilderte Eichverfahren ja überhaupt nicht beseitigt, sondern ausschließlich in ihrem Einfluß auf den Betrag an gebundenen H' und OH' ausgeschaltet. Die Begrenzung aller dieser p_{ah} -Fehler entscheidet also darüber, wie weit dem gebundenen Betrage eines Säure- oder Laugensalzes der richtige p_{ah} zugeordnet ist, wie weit also dem richtigen Ordinatenwert ein richtiger Abszissenwert entspricht.

Die konstanten, systematischen p_{ah} -Fehler: Die erwähnte Diskrepanz der Aktivitätswerte von HCl, die nach verschiedenen Methoden erzielt worden sind, zeigt, daß die verschiedenen galvanischen Meßanordnungen bzw. einige von ihnen einen geringen prinzipiellen Fehler bedingen (s. S. 414). Was das für ein Fehler ist und welche Anordnung er vorzugsweise trifft, ist zurzeit nicht zu entscheiden. Er scheint sich aber auf Lösungen starker Säuren oder Basen (extreme $[H]$) zu beschränken. Die hier verwandte Michaelisanordnung ergibt hohe Aktivitätsfaktoren für $HCl = 1$ (*Michaelis*¹ und experimenteller Teil IIA, Tabelle V), für $n/100 H_2SO_4 =$ etwa 0,9. p_{ah} ist also bei HCl gleich dem negativen Logarithmus der C_H , bei $n/100 H_2SO_4$ um etwa 0,04 größer. Die Abweichung im p_{ah} gegenüber anderen Autoren, die sich aus der Verwendung der Michaelisapparatur ergibt, beträgt für diese Säuren 0,05 bis 0,1 nach der sauren Seite. Analog ist nach *Michaelis*¹ bei etwa $n/100$ bis $n/50 NaOH$ angenommen, daß $f_a = 1$ sei. Für Laugenkonzentrationen dieser Größenordnung wurde dann $p_{aH} = p_{KW} - p_{aOH}$ berechnet. p_{aOH} ergibt sich aus der Potentialdifferenz gegen die Bezugs-elektrode ($n/50$ oder $n/100 NaOH$) nach der Formel:

$$p_{aOH} = \frac{\varepsilon}{RT \cdot 0,4343} + p_{aOH \text{ Bezugs-elektrode}}$$

Daß nicht einfach der gemessene p_{ah} verwandt wurde, beruht darauf, daß er bei $n/50$ wie $n/100$ Lauge um 0,08 kleiner war (siehe experimenteller Teil IIA, Tabelle Va) als bei *Michaelis*. Da aber in alkalischen Lösungen alle denkbaren Fehler (Diffusionspotential, CO_2 -Verunreinigung, O_2 -Spuren, mangelhafte Elektroden) gleichsinnig auf scheinbare Verkleinerung des p_{ah} hinwirken, wurde — allerdings ohne daß solche Fehler nachweisbar waren — das *Michaelissche* Ergebnis als richtiger angenommen.

¹ L. *Michaelis* und Mitarbeiter, l. c.

Diese Annahme bedeutet eine Verschiebung der alkalischsten Versuchspunkte (bei etwa p_{ah} 12) um 0,05 bis 0,1 nach der alkalischen Seite gegenüber den unmittelbar gemessenen Werten.

Zufällige p_{ah} -Messungsfehler: Die zufälligen Messungsfehler sind sehr gering von p_{ah} 5 nach der sauren Seite. Die Differenz von Doppelbestimmungen unterschreitet im allgemeinen (nämlich bei Temperaturkonstanz des Zimmers, es wurde ohne Thermostat gearbeitet) 0,5 Millivolt (s. experimenteller Teil IIA, Tabelle V und IIB). Auf der alkalischen Seite von p_{ah} 8 treten in Doppelbestimmungen Differenzen bis zu 1,5 Millivolt auf, obwohl unter gutem CO_2 -Ausschluß gearbeitet wurde (vgl. experimenteller Teil IIB, S. 448). Am unsichersten ist die p_{ah} -Bestimmung in der isoelektrischen Zone des Myogens von p_{ah} 5 bis etwas über 7 hinaus. Durch Myogenfibrinbildung an den Elektroden wird eine einigermaßen exakte elektrische Messung der $[\text{H}]$ verhindert. *Michaelis*-Indikatoren mit einem p_{ah} -Abstand von 0,1 gestatten nach dem *Walpole*-Prinzip zwar eine Ablesungsgenauigkeit von etwa 0,05, zeigen aber durch das reaktionsfähige Myogen einen Eiweißfehler. Dieser ergibt auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes eine zu alkalische Reaktion, auf der alkalischen Seite einen zu sauren p_{ah} . Der Fehler nimmt mit wachsender Entfernung vom isoelektrischen Punkt zu. Er beträgt zwischen p_{ah} 4 und 5 bereits 0,3 bis 0,4 im p_{ah} , zwischen p_{ah} 7,5 und 8 etwa 0,4 bis 0,8. Er dürfte auch in dem p_{ah} -Bereich nahe am isoelektrischen Punkt, in dem die kolorimetrische Methode zur Anwendung kam (p_{ah} 5,3 bis 7,4), eine Unsicherheit um etwa 0,1 im p_{ah} bedingen (analog einem Fehler von etwa 6 Millivolt) (vgl. experimenteller Teil IIA).

p_{ah} -Fehler durch mizellares Donnangleichgewicht: Falls mizellare Donnangleichgewichte auftreten, ist die C_H im Innern der Mizellen anders als in der intermizellaren Flüssigkeit. Sind diese beiden Größen nicht allzusehr voneinander verschieden, so kann man zur Charakterisierung der a_H^1 , der ein bestimmter Ionisationsgrad zugeordnet ist, den „mittleren“ p_{ah} angeben, d. h. den p_{ah} , der vorhanden sein würde, wenn man sich die $[\text{H}]$ -Differenzen zwischen Mizellen und intermizellarer Flüssigkeit ausgeglichen denkt. Da bei extremem p_{ah} mizellare Donnangleichgewichte bereits als unerheblich oder nicht vorhanden erwiesen sind (vgl. S. 414), bleibt nur zu erörtern, wie weit bei weniger extremen p_{ah} -Werten der mittlere p_{ah} vom intermizellaren p_{ah} abweicht, denn nur den intermizellaren p_{ah} kann man messen. An sich können mizellare Donnangleichgewichte in weniger sauren und alkalischen Lösungen infolge des niedrigen Gesamtelektrolytgehalts eine bedeutend größere Rolle spielen als bei

¹ a_H = aktive Konzentration an H^+ .

sehr extremen p_{ah} . Gerade hier kann aber keine Bestimmung des „nichtlösenden Raumes“ für H' vorgenommen werden (vgl. S. 430 ff.). Dagegen kann ein oberer Grenzwert für die Abweichung des mittleren vom intermizellaren p_{ah} auf anderem Wege wenigstens für HCl-Gemische gewonnen werden. Hierzu sind Cl'-Messungen heranzuziehen. Bei Cl'-Messungen in einem Eiweißsäuregemisch findet man durch Multiplikation des Volumens der Lösung mit der gemessenen, d. h. also der intermizellaren $[Cl]$ nicht die gesamte zugesetzte Chlormenge wieder. Es soll nun die sicher zu weit gehende Annahme gemacht werden, daß diese nicht wieder gefundene Chlormenge sich allein dadurch der Messung entzogen hat, daß die $[Cl]$ im unzugänglichen Inneren der Mizellen höher ist als in der intermizellaren Flüssigkeit. Diese Annahme lautet exakt formuliert folgendermaßen:

$$vc = vc_1 + a \quad (1)$$

v ist das Volumen der Eiweißsäuremischung; c ist die „mittlere“ $[Cl]$, wenn man die Konzentrationsdifferenz zwischen Mizelle und Intermizellarflüssigkeit ausgeglichen denkt, vc also die wahre Chlormenge; c_1 ist die $[Cl]$ der Intermizellarflüssigkeit, vc_1 also die Chlormenge, die sich aus der intermizellaren $[Cl]$ berechnet; a ist schließlich die Chlormenge, die sich in der angegebenen Weise der Messung entzieht. Nach *Donnan* entspricht einer Erhöhung der $[Cl]$ eine Erniedrigung der $[H]$ in den Mizellen gegenüber der intermizellaren Konzentration. Die wahre $[H]$ -Menge des Systems, in analoger Bezeichnungsweise wie in der Cl'-Gleichung vc' , würde sich also aus der intermizellaren $[H]$ (c'_1) zu hoch berechnen ($vc'_1 < vc'$). Es muß von diesem Rechnungsbetrag noch eine unbekannte Menge an $H' = x$ abgezogen werden, also

$$vc' = vc'_1 - x. \quad (2)$$

Die Beziehung zwischen diesen beiden Gleichungen ist durch die *Donnan*-Bedingung gegeben:

$$c_2/c_1 = c'_1/c'_2.$$

Die mit dem Index 2 versehenen Größen bedeuten die $[H]$ bzw. $[Cl]$ im Mizelleninnern. Beim Chlor ist c_2 größer als c_1 , und zwar um den Betrag, der nötig ist, um die oben definierte Chlormenge a unterzubringen, also

$$c_2 = c_1 + a/v_2,$$

wo v_2 das Gesamtmizellarrvolumen darstellt. Beim H' liegen die Verhältnisse, wie bereits gesagt, umgekehrt. Also lautet die analoge Gleichung

$$c'_2 = c'_1 - x/v_2.$$

Werden diese Werte für c_2 bzw. c_2' in die elementare *Donnan*-Gleichung eingesetzt, so ergibt sich für die weitere Betrachtung

$$\frac{c_1 + a/v_2}{c_1} = \frac{c_1'}{c_1' - x/v_2}.$$

Dies lautet nach x aufgelöst:

$$x = v_2 c_1' - \frac{c_1' c_1 v_2}{c_1 + a/v_2}. \quad (3)$$

Das Gesamtmizellarvolumen v_2 der Gleichung (3) ist unbekannt. Es kann im einen Grenzfall (fast!) ebenso groß sein wie das Gesamtvolumen der Eiweißlösung:

$$v_2 = v.$$

Dann heißt Gleichung (3)

$$x = v c_1' - \frac{c_1' c_1 v}{c_1 + a/v}.$$

Dies in Gleichung (2) eingesetzt ergibt:

$$v c' = v c_1' - v c_1' + \frac{c_1' c_1 v}{c_1 + a/v},$$

oder

$$\frac{v c'}{v c_1'} = \frac{c_1}{c_1 + a/v} = \frac{v c_1}{v c_1 + a}.$$

Also ist unter Berücksichtigung von Gleichung (1) für den Nenner der rechten Seite

$$\frac{v c'}{v c_1'} = \frac{v c_1}{v c}$$

oder

$$\frac{c'}{c_1'} = \frac{c_1}{c}, \quad (4)$$

d. h. in diesem Grenzfall verhält sich die intermizellare $[H]$ zu der „mittleren“ $[H]$, d. h. der $[H]$, die durch Beseitigung des mizellaren *Donnan*-Gleichgewichtes entstehen würde, umgekehrt proportional den analogen $[Cl]$. Da angenommen war, daß die mittlere $[Cl]$ so groß ist, wie sich aus der zugesetzten Cl' -Menge errechnet, während die intermizellare $[Cl]$ nur 0,7 dieses Betrages ausmacht, muß bei den H' die „mittlere“ Konzentration sich zu der intermizellaren wie 0,7 zu 1 verhalten, der „mittlere“ p_{ah} demnach um 0,15 größer sein als der intermizellare p_{ah} .

Im anderen Grenzfall kann das Mizellarvolumen (v_2) sehr klein, ähnlich Null sein. In diesem Falle wird der Wert für x nach Gleichung (3)

sehr klein, nahezu 0, da alle Glieder der rechten Seite den Faktor v_2 enthalten. x ist in Gleichung (2) also zu vernachlässigen:

$$vc' = vc'_1$$

oder

$$c' = c'_1. \quad (5)$$

Die „mittlere“ $[H]$ weicht von der intermizellaren praktisch nicht ab, ganz gleich wie hoch die *Donnan*-Proportion an der Wand der Mizelle ist.

Es ergibt sich also ein im ersten Augenblick überraschendes allgemeines Resultat: Weicht die „mittlere“ Konzentration eines Ions durch mizellares *Donnan*-Gleichgewicht von der intermizellaren Konzentration um einen ganz bestimmten Betrag ab, so ist der Betrag der analogen Abweichung für alle entgegengesetzt geladenen diffusiblen Ionen noch völlig unbestimmt; er ist erst festgelegt, wenn das Gesamtvolumen der Mizellen feststeht. Wird die angegebene Abweichung durch sehr wenige Mizellen (kleines Gesamtmizellarvolumen) mit infolgedessen hoher *Donnan*-Proportion hervorgerufen, so entspricht einer hohen Abweichung des Ions, das in der Mizelle in höherer Konzentration ist, eine geringe des entgegengesetzt geladenen [vgl. Gleichung (5)]. Sind dagegen viele Mizellen mit daraus folgender kleiner *Donnan*-Proportion Ursache dieser Abweichungen, so werden die Abweichungen für entgegengesetzt geladene diffusible Ionen mehr und mehr gleich [vgl. Gleichung (4)].

Der obere Grenzwert für die Abweichung des „mittleren“ vom intermizellaren p_{ah} beträgt für die HCl-Versuche dieser Arbeit 0,15. Die beiden Voraussetzungen, unter denen er errechnet wurde, dürften viel zu weit gehen: Denn das Chlordefizit beruht sicher nicht ausschließlich auf mizellarem *Donnan*-Gleichgewicht. Inaktivierung und Bindung des Cl' durch das Myogen dürften wahrscheinlich die Hauptschuld am Verschwinden des Cl' tragen. Außerdem ist sicher das Gesamtmizellarvolumen nicht annähernd so groß wie das Gesamtvolumen der Eiweißlösung; Viskositätsbestimmungen ergeben für eine 1%ige Myogenlösung von p_{ah} 1,5 ein Gesamtvolumen der dispersen Phase (also für Mizellen + ionendisperses Eiweiß) von noch nicht 13%. Und selbst dieses Ergebnis dürfte noch etwas zu hoch sein (s. S. 432).

Es beeinflussen also mizellare *Donnan*-Gleichgewichte die H' -Bindungskurve des Myogens aus HCl auch bei niedrigerem HCl-Gehalt (höheren p_{ah}) nicht in irgendwie nennenswertem Umfang. Dies Ergebnis kann unbedenklich auf die OH' -Bindungskurve aus NaOH übertragen werden. Während nämlich nach früheren Untersuchungen¹ alle Anionen

¹ H. H. Weber, l. c.

auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes des Myogens einen deutlich dispersitätsvermindernden Einfluß ausüben, tritt dieser für alle Alkalisalze bereits in der Gegend des isoelektrischen Punktes ganz zurück¹. Dagegen ist es zweifelhaft, ob die beschriebene Einflußlosigkeit mizellarer *Donnan*-Gleichgewichte ebenso für die H'-Bindung aus Lösungen mit Anionen höherer spezifischer Wirksamkeit oder Konzentration gilt (stärker dispersitätsmindernde Lösungen wie HCl-NaCl-Gemische, H₂SO₄, HSCN, vgl. dazu S. 427).

Zusammenfassend ergibt sich: Eine nennenswerte Deformation der H'-OH'-Bindungskurve des Myogens kommt nur durch Alkalihydrolyse in Frage. In extrem alkalischen Lösungen kann die gebundene OH'-Menge hierdurch bis zu 25 % zu hoch, der p_{ah} etwa 0,15 zu sauer erscheinen. Mizellare *Donnan*-Gleichgewichte fälschen die Bindungskurve wenigstens aus HCl und NaOH überhaupt nicht. Die erörterten aktivitätstheoretischen Schwierigkeiten sowie die meist geübte Vernachlässigung des „nichtlösenden Raumes“ machen die Bestimmung des gebundenen Anteils nur in Lösungen von extremem p_{ah} (s. S. 412 f.) unsicher. Diese Unsicherheit dürfte 10% nicht überschreiten. Die richtigen p_{ah} -Werte dürften von den angegebenen nirgends mehr als 0,1 (Differenz von Doppelbestimmungen im allgemeinen unter 0,01) abweichen.

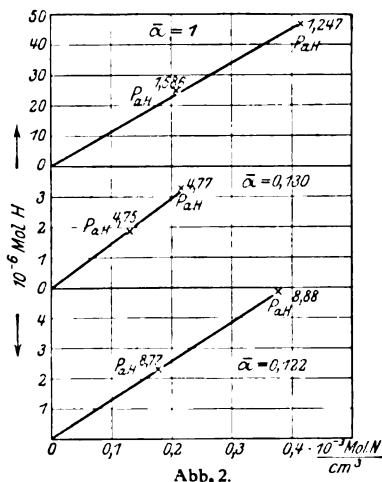


Abb. 2.
Die Abhängigkeit der H'- bzw. OH'-Bindung von der Myogenkonzentration.

IV. H'- bzw. OH'-Bindungskurve und Äquivalentgewicht des Myogens.

Die H' und OH'-Bindung des Myogens hängt in erster Linie ab:

1. von der Eiweißkonzentration,
2. vom p_{ah} .

Die Abhängigkeit vom übrigen Ionenmilieu wird im nächsten Abschnitt besprochen. Ob außerdem eine Temperatureinfluß besteht, wurde nicht untersucht.

Vonder Eiweißkonzentration hängt die H' und OH'-Bindung bei konstantem p_{ah} geradlinig ab, wie Abb. 2 für extrem saure und alkalische Reaktion zeigt. Die Verschiedenheit des p_{ah} für die Versuchspunkte in Kurve 1 ist belanglos, da auf der sauren Seite mit dem p_{ah} nicht ändert. Die kleine p_{ah} -Verschiedenheit in Kurve 3 bedingt eine Änderung der OH'-

¹ H. H. Weber, l. c.

Bindung um 4 % (vgl. Abb. 3). Diese kann also gegenüber der konzentrationsabhängigen Differenz der beiden Versuchspunkte von etwa 100 % vernachlässigt werden.

Die H^+ und OH^- -Bindung wächst also nicht nur bei völlig ionisiertem Myogen (zwischen p_{aH} 1 und 2) geradlinig mit der Eiweißkonzentration — das ist ja die Vorbedingung für die Existenz eines konstanten Äquivalentgewichtes —, sondern auch bei nur teilweiser Ionisierung. Der Normalitätsgrad $\bar{\alpha}$ beträgt für das Myogen als Kation (Kurve 2) 0,130, der Normalitätsrest $\bar{\rho}$ 0,87¹. Für Myogen als Anion (Kurve 3) lauten die entsprechenden Größen 0,122 und 0,878. Bestimmte scheinbare Abweichungen von dem erörterten Gesetz werden später besprochen, da sie eine notwendige Konsequenz des „nichtlösenden Raumes“ sind. Diese Abweichungen sind sehr klein und nur in sehr sauren Lösungen vorhanden (vgl. S. 430 ff.)

Die Abhängigkeit der H^+ - und OH^- -Bindung vom p_{aH} kann nicht bei konstanter Myogenkonzentration untersucht werden, da Lösungen dieses Proteins durch Spontandenaturierung ihre Konzentration von Tag zu Tag ändern. Doch gestattet die einfache geradlinige Abhängigkeit der H^+ - und OH^- -Bindung von der Eiweißkonzentration alle Resultate auf eine bestimmte Masseneinheit umzurechnen, auch wenn sie an Lösungen verschiedener Konzentration gewonnen sind. Als Masseneinheit ist das Millimol Myogenstickstoff gewählt (Abb. 3). Die im allgemeinen geringe Streuung der Versuchspunkte läßt keine Beziehung zur Myogenkonzentration der Lösungen erkennen, an denen die Befunde erhoben sind (vgl. experimenteller Teil II, Tabelle VII bis X). Diese Streuung hält sich auch, wenigstens bezüglich der H^+ - und OH^- -Bindung aus HCl und $NaOH$, innerhalb der Grenzen, die in der Fehlerbetrachtung des vorigen Abschnittes gesteckt waren². Die Bindung aus anderen Elektrolytgemischen weicht nicht wesentlich davon ab (vgl. dazu S. 426 ff.)

¹ Der Begriff „Normalitätsgrad“ bezeichnet die Menge ionisierter Valenzen eines mehrwertigen Elektrolyten im Verhältnis zur Gesamtmenge seiner sauren bzw. basischen Valenzen (dissoziiert + undissoziiert), also das Verhältnis der dissoziierten zur gesamten Normalität. Normalitätsrest bezeichnet analog das Verhältnis der undissoziierten zur Gesamtnormalität. Diese Begriffe unterscheiden sich von dem *Michaelisschen* Dissoziationsgrad und seinem Dissoziationsrest dadurch, daß letztere Begriffe die Konzentration undissoziierter bzw. in einer bestimmten Valenzstufe dissoziierter Moleküle im Verhältnis zur Gesamtmolarität angeben. Die beiden Begriffskategorien sind also nur für einwertige Elektrolyte identisch. (Über die Bedeutung ihrer Unterscheidung und über ihre rechnerische Beziehung vergleiche die voranstehende Mitteilung.)

² Es sei hierbei bemerkt, daß die Kurve Versuchspunkte von allen verwandten Myogenpräparaten, d. h. von 20 oder mehr Kaninchen enthält.

Die Basendissoziationskonstanten des Myogens ordnen sich so, daß die Basendissoziation durch die Dissoziation einer einwertigen Base mit der Konstanten $K = 3,5 \cdot 10^{-11}$ und ein Gesamtsäurebindungsvermögen von $115 \cdot 10^{-3}$ Millimol H^+ dargestellt werden kann. Die „fiktive“¹ Basendissoziationskonstante des Myogens beträgt somit $K_B = 3,5 \cdot 10^{-11}$ *. Die so errechnete Kurve weicht von der experimentell gefundenen nur in der Nähe des isoelektrischen Punktes erheblich ab (p_{ah} 4,4 bis 6,3 durch gestrichelte Zeichnung der errechneten Kurve in Abb. 3 angedeutet). Die erste (oder die ersten) Basendissoziationskonstante des Myogens ist also zu groß, als daß sie sich durch die angegebene „fiktive“ Konstante darstellen ließe.

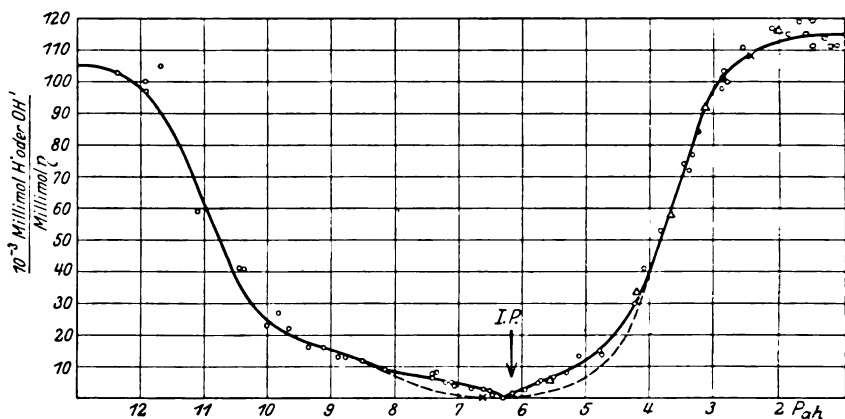


Abb. 3. Die H^+ bzw. OH^- -Bindung auf ein Millimol Myogenstickstoff als Funktion des p_{aH} .

○—○ Bindung aus HCl und $NaOH$. Δ — Δ aus H_2SO_4 .

⊙ aus $HCl + m/30 NaCl$. $\times$ aus $HSCN$.¹

Die Ionisierung des Myogens als Säure läßt sich überhaupt nicht durch eine einzige „fiktive“ Dissoziationskonstante geben. Sie steigt deutlich in zwei Stufen. Die erste liegt zwischen p_{aH} etwa 9 bis 10 und dem isoelektrischen Punkt, die zweite zwischen p_{aH} 9 bis 10 und 13. Die erste Ionisierungsstufe läßt sich recht gut durch die Dissoziation einer einbasischen Säure mit der Dissoziationskonstanten $K_a = 6,3 \cdot 10^{-9}$ und einem Gesamtlaugenbindungsvermögen von $17 \cdot 10^{-3}$ Millimol OH^- beschreiben. Für die zweite Ionisierungsstufe lauten die analogen Daten: $K = 1 \cdot 10^{-11}$ und $89 \cdot 10^{-3}$ Millimol OH^- . Die Addition der

¹ Über den Unterschied von „fiktiven“ und „wahren“ Dissoziationskonstanten vergleiche die voranstehende Mitteilung.

* Nach der Reaktionsformel einer Ammoniumbase geschrieben lautet sie: $\frac{RNH_2 \cdot H^+}{RNH_3^+} = K_b = 2,2 \cdot 10^{-4}$.

beiden OH'-Bindungskurven, die sich aus diesen Werten für die zwei erkennbaren Dissoziationsstufen des Myogens errechnen, ergibt die entsprechende Kurve für das Myogen. Man kann also die beiden angegebenen Dissoziationskonstanten als die erste und zweite „fiktive“ Säuredissoziationskonstante des Myogens bezeichnen $K_{a_1} = 6,3 \cdot 10^{-9}$, $K_{a_2} = 10^{-11}$. Man muß dabei allerdings das in beiden Dissoziationsstufen verschiedene Gesamt-OH'-Bindungsvermögen im Auge behalten. Diese Verschiedenheit bedeutet, daß mindestens in der Dissoziationsstufe mit dem höheren Gesamtlaugenbindungsvermögen von einem Eiweißmolekül *mehrere* OH' gebunden werden, daß sich also mindestens diese Dissoziationsstufe aus mehreren äußerlich verschmelzenden Einzelstufen zusammensetzt. In Wirklichkeit dürfte dies für beide erkennbaren Dissoziationsstufen gelten. Denn es würde sich unter der Annahme, daß ein Proteinmolekül in der Stufe mit der niedrigen Gesamtlaugenbindung nur *eine* elektrische Ladung aufnimmt, ein unwahrscheinlich niedriges Molekulargewicht für das Myogen ergeben (s. u. unter Äquivalentgewichte). Ferner besteht eine geringe, aber deutliche Abweichung der errechneten von der experimentellen Ionisierungskurve in der Nähe des isoelektrischen Punktes (durch gestrichelte Zeichnung der errechneten Kurve in ihrem abweichenden Teil angedeutet). Auch dies spricht dafür, daß auch in der ersten erkennbaren Dissoziationsstufe trotz ihrer verhältnismäßigen Kleinheit in Wahrheit mehrere Stufen enthalten sind, deren erste eine Konstante besitzt, die zu groß ist, um sich der Darstellung durch die angegebene „fiktive“ Konstante zu fügen.

Die Errechnung der „wahren“ aus den „fiktiven“ Dissoziationskonstanten hat die Kenntnis der Wertigkeit des Myogens als Kation und als Anion zur Voraussetzung. Diese Voraussetzung ist nicht gegeben, da zurzeit das Molekulargewicht des Myogens unbekannt ist.

Als eindeutige physikochemischen Konstanten gibt die Ionisierungskurve dagegen die Äquivalentgewichte für vollkommene Dissoziation als Kation und als Anion. Unter der Annahme, daß ein Millimol N = 86,1 mg Myogen ist (vgl. S. 409), ergibt sich ein Äquivalentgewicht des Kations von 750, des Anions elektrotitrimetisch von 815, durch Willstätter-Titration von 1047. Da letztere Methode bei labilen genuinen Proteinen leicht etwas zu hohe Äquivalentgewichte ergibt, erscheint ein Mittelwert von etwa 950 am wahrscheinlichsten. Eine 1%ige Myogenlösung ist demnach als Base $1,34 \cdot 10^{-2}$ normal, als Säure etwa $1,05 \cdot 10^{-2}$.

Das in der ersten Stufe mit der „scheinbaren“ Dissoziationskonstanten $K_{a_1} = 6,3 \cdot 10^{-9}$ als Säure vollständig dissoziierte Myogen hat ein Äquivalentgewicht von 5100. Nimmt man an, daß bei vollständiger Dissoziation in dieser Stufe jedes Proteinmolekül nur *eine*

elektrische Ladung trägt, so wäre dieser Wert auch der des Molekulargewichtes. Doch dürfte diese Annahme schon deshalb falsch sein, weil 5100 einen unwahrscheinlich niedrigen Wert für das Molekulargewicht des Myogens darstellen würde.

V. *Über die aktive Normalkonzentration einiger Myogensalze.*

Die H^+ - bzw. OH^- -Bindungskurve gibt an, welche Normalkonzentration an Proteinalkali bzw. Säuresalz eine bestimmte Eiweißmenge bei einem bestimmten p_{ah} bildet. Nach neueren Anschauungen, die besonders auf *Wo. Pauli*¹ zurückgehen, kommt es aber für das kolloidale Verhalten der Proteine (Quellung, Viskosität, Fällbarkeit) nicht nur hierauf an, sondern vor allem auch darauf, wieviel von dem Eiweißkörper als aktives Salz vorliegt. Für den Biologen bietet aber gerade dieses kolloidale Verhalten vielfach den entscheidenden Gesichtspunkt.

Die aktive Normalkonzentration der Proteinsalze kann sich nun von ihrer Gesamtnormalkonzentration aus zwei Gründen unterscheiden.

1. Können durch interionische Kräfte die Ionen des Eiweißsalzes teilweise inaktiviert sein.

2. Kann ein Teil der Eiweißvalenzen mit den Gegenionen des Eiweißes zu undissoziierten Salzgruppen zusammengetreten sein.

Das Verhältnis der aktiven Konzentration der Salzionen zu ihrer Gesamtkonzentration (das durch die unter 1. angeführten Kräfte bestimmt ist) wird als *Aktivitätsfaktor* bezeichnet, das Verhältnis der dissoziierten Salzkonzentration zu der Gesamtkonzentration (wie es durch den Vorgang 2. bestimmt ist) als *Salzdissoziationsgrad*. Da bei so komplizierten und schwachen Elektrolyten wie den Proteinen nicht sicher gesagt werden kann, in welchem Umfang diese beiden Größen an dem Unterschied zwischen aktiver und gesamter Normalkonzentration der Proteinsalze beteiligt sind, soll für das Verhältnis der aktiven zur gesamten Normalkonzentration der nichts voraussetzende Ausdruck *Aktivitätsgrad* hier angewandt werden.

Beim Myogen liegt nun die Annahme nahe, daß die aktive Normalkonzentration seiner *Säuresalze* wesentlich kleiner als ihre gesamte Normalkonzentration, ihr Aktivitätsgrad also wesentlich kleiner als 1 ist. Myogen wird nämlich auf der sauren Seite seines isoelektrischen Punktes durch Säurerestanionen auffallend leicht gefällt und auch elektrisch entladen². Auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes —

¹ *J. Frisch, W. Pauli, E. Valkó*, diese Zeitschr. **164**, 401, 1925; *W. Pauli und H. Wit*, 1. c.

² *H. H. Weber*, 1. c.

also für Myogenalkalisalze — ist das anders¹. Deren Aktivitätsgrad ist deshalb nicht untersucht worden. Die Wirkung der Säurerestanionen nimmt außerdem von Acetat', Cl', Phosphat' nach SCN', $\frac{SO_4'}{2}$ und anderen sehr stark zu¹. Dies legt den Verdacht nahe, daß der Aktivitätsgrad der Myogensalze mit diesen Anionen auch noch sehr verschieden ist. Nun ist die Frage nach dieser Verschiedenheit von geringer *biologischer* Bedeutung, weil das Myogen im Muskel nur mit Anionen gleicher und relativ sehr geringer Fällungskraft (Cl', Phosphat') zusammentrifft. Da diese Frage aber andererseits von prinzipiellem Wert für die Erklärung der spezifischen Anionenwirkung ist (Hofmeister-Reihen), soll sie in einer besonderen Mitteilung² beantwortet werden.

Hier soll nur ganz kurz das angeführt werden, was aus den bereits mitgeteilten Daten über die H'-Bindung für dieses Problem ableitbar ist. Die H'-Bindung hängt nämlich in gewissem Umfange von dem Aktivitätsgrad der entstehenden Salze ab. Diese Abhängigkeit ist im einzelnen in Kapitel III der voranstehenden Mitteilung abgeleitet, das zur näheren Begründung der folgenden Resultate einzusehen ist.

Beim Myogen hat die Beurteilung davon auszugehen, daß die H'-Bindung aus H₂SO₄ (Bildung von Myogensulfat) in allen Teilen der H'-Bindungskurve die gleiche ist wie bei der Bildung von Myogenchlorid aus HCl (vgl. Abb. 3 und experimenteller Teil II, Tabelle VIII und IX). Für die H'-Bindung aus HSCN und HCl + m/30 NaCl liegen nur Versuchspunkte bei stärker saurer Reaktion, d. h. in größerer Entfernung vom isoelektrischen Punkte vor. Zum mindesten dort ist die H'-Bindung auch aus diesen Elektrolytsystemen ungefähr dieselbe wie aus reiner HCl (vgl. Abb. 3 und experimenteller Teil II, Tabelle IX). Diese Messungen sind allerdings mit einer etwas größeren Unsicherheit behaftet als die übrigen dieser Mitteilung, weil in diesen stärker dispersitätsmindernden (s. oben) Systemen mikellare Donnanfehler der p_{aH} -Bestimmung nicht so sicher auszuschließen sind wie in den reinen Myogen-HCl-Gemischen.

Aus dieser Gleichheit der H'-Bindung ist nicht ohne weiteres auf Gleichheit des Aktivitätsgrades der entstehenden Salze zu schließen. Es ist vielmehr festzustellen, welche Unterschiede des Aktivitätsgrades innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung der H'-Bindungskurve möglich sind.

Dann ergibt sich: Unmittelbar auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes, d. h. für Myogenchlorid und -sulfat bei Neutralsalzbwesenheit kann sich der Aktivitätsgrad dieser beiden Salze nicht wesentlich mehr unterscheiden wie 1 zu 0,5. Denn Halbierung bzw. Verdoppelung des Aktivitätsgrades bewirkt bei der Dissoziation der ersten Valenz eines vielwertigen Elektrolyten eine Verschiebung der H'-Bindungskurve um etwa 0,2 bis 0,3 im p_{aH} . Es ist hierbei gleichgültig, ob der Aktivitätsgrad vorwiegend durch die Größe des Aktivitätsfaktors oder des Salzdissoziationsgrades bestimmt ist (vgl. Abb. 1 und 3 der voranstehenden Mitteilung). Dagegen schwankt er innerhalb der angegebenen Grenzen (0,2 bis 0,3 im

¹ H. H. Weber, l. c.

² P. Rona und H. H. Weber, „Über die aktive Normalkonzentration einiger Myogensalze“, erscheint demnächst in dieser Zeitschrift.

p_{ah}) je nach der gegenseitigen Lage der wahren Dissoziationskonstanten (vgl. I. c., Abb. 1).

In größerer Entfernung vom isoelektrischen Punkte, d. h. für den Vergleich von Myogenchlorid, -sulfat und -rhodanid in neutralsalzfreier Lösung und Myogenchlorid bei NaCl-Gegenwart ist über die komplexe Größe Aktivitätsgrad überhaupt keine Aussage auf Grund der H^+ -Bindung möglich, denn diese wird durch die beiden Komponenten des Aktivitätsgrades, durch den Aktivitätsfaktor und den Salzdissoziationsgrad verschieden beeinflusst. Es ist also für diese beiden Größen einzeln festzustellen, wieweit sie sich bei den angeführten Myogensalzen unterscheiden können, obwohl die H^+ -Bindung bei der Bildung dieser Salze (bei gegebenen p_{ah}) gleich ist. Dazu ist zu sagen: Der Aktivitätsfaktor kann auch unter dieser Bedingung so verschieden sein (für ein Salz 5- bis 10mal so groß wie für ein anderes, vgl. S. 392 ff. der voranstehenden Mitteilung), daß eine Grenzangabe für seine mögliche Verschiedenheit in größerer Entfernung vom isoelektrischen Punkte ohne Wert erscheint. Dagegen sollte sich der Dissoziationsgrad der angeführten Myogensalze weniger unterscheiden wie 1 zu 0,3, denn Herabsetzung des Salzdissoziationsgrades auf ein Drittel führt auch bei der H^+ -Bindung in den höchsten Valenzen vielwertiger Elektrolyte zu einer Verschiebung der H^+ -Bindungskurve um etwa 0,3 im p_{ah} , falls dieser Salzdissoziationsgrad für alle an der Salzbildung beteiligten Eiweißvalenzen einigermaßen gleichmäßig gilt (vgl. S. 397 f. der voranstehenden Mitteilung). Es bleibt also trotz der gleichen H^+ -Bindung bei der Bildung der verschiedenen Myogensalze eine ganz beträchtliche Verschiedenheit in ihrem Dissoziationsgrad und — in größerer Entfernung vom isoelektrischen Punkt — sogar eine sehr große Verschiedenheit in ihrem Aktivitätsfaktor möglich, woraus sich die spezifischen Anionenwirkungen gegenüber dem Myogen eventuell erklären lassen. Absolute und exakt vergleichbare Werte für den Aktivitätsgrad lassen sich dagegen aus den aktiven Konzentrationen der Säurerestgegenionen des Myogens gewinnen. Doch sollen, wie erwähnt, die diesbezüglichen Untersuchungen in anderem Zusammenhang (s. S. 427) mitgeteilt werden.

Hier sollen nur einige Angaben über den mit Hilfe der Chloraktivität besonders leicht feststellbaren Aktivitätsgrad des Myogenchlorids gemacht werden. Im Muskel nämlich sind die hauptsächlichen Anionen Cl' und Phosphat', die als Myogensalz einen sehr ähnlichen Aktivitätsgrad ergeben¹. Feststellungen über den Aktivitätsgrad des Myogenchlorids geben also einen gewissen Aufschluß darüber, wieweit unter biologischen Verhältnissen voraussichtlich die im vorigen Kapitel aus der H^+ -Bindung berechnete Normalkonzentration der Myogensäuresalze von der — für das kolloidale Verhalten so wichtigen — aktiven Normalkonzentration abweicht.

Der Aktivitätsgrad des Myogenchlorids wird am einfachsten mit der Kalomelelektrode festgestellt. Hierbei wurde angenommen, daß der Aktivitätsfaktor der Cl' der reinen HCl gleich der der $H^+ = 1$ ist. Die in dieser, wie jeder Annahme über die Aktivität der HCl-Ionen liegende Unsicherheit (vgl. S. 414) ist in der Auswertung der Cl' -Messungen nicht

¹ Vgl. P. Rona und H. H. Weber, I. c.

durch ein Eichverfahren zu umgehen wie bei den H^+ -Messungen (vgl. S. 415). Denn hier kommt es ja nicht auf die Ionenkonzentration, sondern gerade auf ihre Aktivität an, da es ja nicht unbedingt gesagt ist, daß sich überhaupt die Konzentration der Chlorionen der HCl durch den Myogenzusatz ändert. Doch können, sobald der Aktivitätsfaktor der Cl' der HCl eindeutig feststeht (vgl. dazu die widersprechenden Angaben von C. Drucker und G. Riethof einerseits, G. Skatchard und W. Pauli¹ andererseits) die unten angeführten Ergebnisse entsprechend korrigiert werden. Eine solche Korrektur hat auf Grund folgender Tatsache zu erfolgen: Konstante und systematische Messungsfehler infolge der Azidität der Lösungen sind ausgeschaltet, indem das Cl' -Potential zwischen Myogen-HCl-Mischungen und HCl ungefähr gleicher C_H gemessen wird. Die Potentialdifferenz gibt dann an, wievielfach größer die Cl' -Aktivität im Eiweißgemisch ist als in der reinen HCl der Vergleichselektrode. Unter der oben diskutierten Annahme, daß in reiner HCl die Cl' -Aktivität gleich der HCl-Konzentration sei, folgt daraus die absolute Cl' -Aktivität des Eiweißgemisches. Hiervon wird, um zur aktiven Konzentration des Eiweißsalzes zu kommen, die Cl' -Aktivität abgezogen, die auf die freie HCl des Gemisches entfällt. Es ist angenommen (s. oben), daß diese gleich der gemessenen H^+ -Aktivität des Proteingemisches ist. Die aktive Normalkonzentration des Proteinsalzes dividiert durch seine gesamte Normalkonzentration, die aus der H^+ -Bindung festgestellt ist, ergibt den Aktivitätsgrad des Myogenchlorids. Er dürfte durch Ungenauigkeiten der Messung in den reinen Myogen-HCl-Gemischen um etwa 0,05, in den Versuchen mit NaCl-Gegenwart um 0,1 unsicher sein (bezüglich der methodischen Einzelheiten siehe experimenteller Teil III.)

Der so ermittelte Aktivitätsgrad des Myogenchlorids fällt in reiner HCl von p_{aH} 3 bis 1,5 von etwa 0,7 auf etwa 0,5 (vgl. experimenteller Teil III, Tabelle 12). Abgesehen von den oben behandelten Unsicherheiten stellen diese Werte untere Grenzwerte dar. Es ist nämlich nicht auszuschließen, daß die Verminderung der intermizellaren Cl' -Aktivität zum Teil darauf beruht, daß im Innern etwaiger Mizellen die $[Cl]$ durch Donnan-Gleichgewicht erhöht ist. Bei einer Azidität kleiner als p_{aH} 3 scheint demnach der Aktivitätsgrad von Myogenchlorid in reiner HCl nahe 1 (zwischen 1 und 0,7) zu liegen, die Aktivität dieses Salzes also ähnlich seiner Normalität zu sein.

In HCl-NaCl-Gemischen wird in etwa m/30 NaCl zwischen p_{aH} 2 und 3 nach Prüfung mit der Kalomelektrode der Aktivitätsgrad des Myogenchlorids anscheinend nicht unerheblich auf etwa 0,4 gedrückt (vgl. experimenteller Teil III, Tabelle XII). In einer früheren Mitteilung² wurde bei Anionenflockung des Myogens in Salzlösungen mittlerer Konzentration eine nicht unerhebliche Anionenbindung durch den geflockten Anteil dieses Proteins *kataphoretisch* festgestellt. Diese Bindung könnte im gewissen Umfang in Salzlösungen auch durch das *gelöst bleibende* Protein stattfinden, wenn man die angegebene Erniedrigung

¹ Literatur W. Pauli und H. Wit, l. c., S. 310ff.

² H. H. Weber, l. c.

des Aktivitätsgrades in klaren oder nur eben getrübbten NaCl-haltigen Lösungen so deuten will.

Man wird also in physiologischen Salzlösungen mit einem gewissen Zurückbleiben der Myogensäuresalzaktivität hinter der entsprechenden Normalität zu rechnen haben. Bei den Alkalisalzen des Myogens ist diese Frage nicht untersucht, eine solche Tatsache aber aus den angeführten Gründen des kolloidalen Verhaltens (s. S. 426 f.) auch weniger wahrscheinlich.

VI. Der „nichtlösende“ Raum für H' in Myogenlösungen.

Der „nichtlösende Raum“ für H' hat nicht nur Bedeutung für die Berechnung der H' und OH'-Bindungskurve (vgl. S. 413), sondern ist auch an sich von Bedeutung: Lagern sich nämlich Proteinionen eine große Wasserhülle an, einen Hydratationsmantel, wie *Wolfgang Pauli* behauptet und *Jaques Loeb* bestreitet, so sollte der „nichtlösende Raum“ größer, möglicherweise sehr viel größer sein als das Eigenvolumen des Proteins. Der Vergleich des Eigenvolumens des Myogens mit seinem „nichtlösenden Raum“ wirft also ein gewisses Licht auf die Frage seiner Hydratation.

Der „nichtlösende Raum“ für H' ist bei Proteinen nur nach der von *Polanyi*¹ angegebenen Verdünnungsmethode zu bestimmen.

Sie gründet sich auf folgende Überlegung: Löse ich eine bestimmte Menge eines Stoffes (z. B. H') in zwei verschiedenen Volumina eines Lösungsmittels, so sind die Konzentrationen beider Lösungen umgekehrt proportional ihren Volumina

$$c_1/c_2 = v_2L/v_1L.$$

Hier sind c_1 und c_2 die beiden Konzentrationen, v_1L und v_2L die beiden Volumina, in denen der Stoff gelöst ist. Diese beiden Volumina sind kleiner als die Gesamtvolumina des Systems, falls in dem System auch noch ein „nichtlösender Raum“ vorhanden ist:

$$v_2L = v_2 - x$$

und

$$v_1L = v_1 - y,$$

worin v_2 und v_1 die Gesamtvolumina der beiden Systeme und x und y die Volumina des „nichtlösenden Raumes“ bezeichnen. Bringe ich das Volumen v_1 durch Verdünnen mit dem reinen Lösungsmittel auf v_2 , so ist natürlich der Gesamtbetrag des „nichtlösenden Raumes“ in beiden Volumina gleich ($x = y$) und es ergibt sich:

$$\frac{c_1}{c_2} = \frac{v_2 - x}{v_1 - x};$$

also

$$x = \frac{c_1 v_1 - c_2 v_2}{c_1 - c_2}.$$

¹ l. c.

Da in den angeführten Versuchen die Eiweißlösung genau auf das Doppelte verdünnt wird, kann $v_1 = 1$ und $v_2 = 2$ gesetzt werden. Hierdurch ergibt sich dann x als Bruchteil des Gesamtvolumens des Systems. Die Gleichung nimmt endgültig die spezielle Form an:

$$x = \frac{c_1 - 2c_2}{c_1 - c_2}.$$

Solche Messung ist nur unter zwei Voraussetzungen statthaft:

1. Die $[H]$ darf sich bei der Verdünnung ausschließlich durch die Änderung des lösenden Raumes ändern, d. h. das Eiweiß darf dabei weder H^+ binden noch abgeben;

2. muß das Volumen des „nichtlösenden Raumes“ bei der Verdünnung konstant bleiben.

Die erste Bedingung ist erfüllt, indem in einem p_{aH} -Bereich (1 bis 1,7) untersucht wurde, in dem Myogen mit H^+ gesättigt ist (vgl. Abb. 3).

Dagegen läßt sich die Konstanz des „nichtlösenden Raumes“ auf Grund der bisher mitgeteilten Resultate nicht beweisen. Es wäre denkbar, daß dieser Raum sich bei der Verdünnung durch eine Änderung der Eiweißhydratation ändert. Ob das so ist, wird zurzeit mit geeigneten anderen Methoden untersucht. Wenn es nun auch nicht der Fall zu sein scheint, so sollen die folgenden Daten über den „nichtlösenden Raum“ doch mit einem gewissen Vorbehalt mitgeteilt werden.

Die Messung von c_1 und c_2 (also der H^+ -Konzentrationen) erfolgt elektrometrisch. Die Kenntnis der absoluten Aktivitätsfaktoren der freien Säure in dem Gemisch ist nicht erforderlich, da es nur auf das Verhältnis c_1/c_2 ankommt. Es ist auf Grund des Eichverfahrens angenommen, daß der Aktivitätsfaktor der H^+ für c_1 und c_2 für die Messung mit der angewandten Apparatur gleich ist. Ein Fehler kommt nur insoweit in Frage, wie diese Voraussetzung bei Eiweißgegenwart nicht mehr stimmt. Doch sind hierfür keine sicheren Anhaltspunkte vorhanden (s. S. 414 ff.).

Tabelle II.

% Nichtlösender Raum	% Myogen	Nichtlösender Raum g Myogen	Wasserhülle =
			Nichtlösender Raum — Eigenvol. Eigenvol.
8	2,84	2,82	2,85
7,5	2,87	2,62	2,58

Die Resultate der Tabelle zeigen eine überraschende Kleinheit des „nichtlösenden Raumes“. Er beträgt für das Gramm maximal säureionisierten Myogens noch nicht 3 ccm. Berechnet man denjenigen Betrag, der auf den Hydratationsmantel des Proteins entfällt, durch Abzug des Eiweißeigenvolumens (s. S. 410), so ergibt sich die nicht

H' lösende Wasserhülle als $2\frac{1}{2}$ - bis 3 mal so groß wie das Eigenvolumen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Myogen als lyophiles Kolloid auch unionisiert eine Wasserhülle tragen muß, bleibt nicht viel Raum für eine Hydratationszunahme bei der Ionisierung. Die starke Hydratationszunahme der Eiweißionen ist von *Pauli*¹ aus Viskositätsmessungen erschlossen. Daß das Myogen ebenfalls die von diesem Autor als hauptsächlichstes Argument der Ionenhydratation angeführte hohe Viskosität zeigt, geht aus Tabelle III hervor.

Tabelle III.

Viskositätsvolumen und Hydratation bei p_{ah} 1,46.

	% Myogen	$\frac{\eta}{\eta_0}$	Viskositätsvol. in % $= \left(\frac{\eta}{\eta_0} - 1 \right) \frac{100}{2,5} = V$	$\frac{V}{V_B}$	$\frac{c \text{ Myogen}}{c_B \text{ Myogen}}$	Wasserhülle = Visk. Vol. - Eigenvol. Eigenvol.
A	0,193	1,058	2,32	0,48	0,5	15,5
B	0,387	1,122	4,88	1,00	1,00	15,8
C	0,78	1,242	9,68	1,98	2,00	15,5
D	1,16	1,397	15,87	3,25	3,00	17,2

Es ergibt sich für maximal säureionisiertes Myogen von p_{ah} 1,46 ein Volumen des Hydratationsmantels von der 15fachen Größe des Eiweißvolumens.

Nur die höchstkonzentrierte Lösung *D* (mit 15%iger disperser Phase) zeigt ein noch höheres Ergebnis. Doch dürften hier bereits Elastizitätsphänomene (Strukturviskosität) hineinspielen.

Die außerordentliche Diskrepanz in der Größe des Hydratationsmantels maximal säureionisierten Myogens einerseits als „nichtlösender Raum“, andererseits als disperse Phase der Viskositätsbestimmung macht eine genaue Untersuchung darüber notwendig, wie groß er in Wirklichkeit ist. Diese findet ebenfalls zurzeit statt.

Die Entscheidung dieser Frage ist für den Biologen aus energetischen Gründen sehr wichtig: Findet die Wasseraufnahme bei Ionisierung des Eiweißes durch Zunahme seiner Affinität zu Wasser statt (durch Hydratation im Sinne *Paulis*), so kann dieser Vorgang unter Umständen mit sehr großer Kraft erfolgen. Ist er dagegen kolloidosmotisch bedingt (Donnangleichgewicht, *Jaques Loeb*), so hat man besonders unter den Verhältnissen des Organismus nur mit unbeträchtlichen Kräften zu rechnen. So ist z. B. eine Säurequellungstheorie der Muskelkontraktion auf kolloidosmotischer Grundlage schon rein energetisch unmöglich, während man ihr als Hydratationstheorie wenigstens in dieser Hinsicht keine begründeten Einwendungen machen kann.

¹ Vgl. z. B. *W. Pauli*, Kolloidchemie der Eiweißkörper. Dresden, Steinkopff, 1920.

VII. Physiologische Folgerungen.

Die angegebenen physikochemischen Eigenschaften des Myogens gestatten zurzeit nur wenige Aussagen über die Funktion des quergestreiften Muskels.

Das Myogen hat von den Muskelproteinen den alkalischsten isoelektrischen Punkt. Es kommt darum am meisten für eine physiologische Säureionisierung als Vorbedingung einer Säurequellung in Frage. Nun ist aber sein Normalitätsgrad auf der alkalischen Seite seines isoelektrischen Punktes bei p_{ah} 7,3 (etwa dem Ruhe- p_{ah}) ebenso groß wie auf der sauren Seite bei p_{ah} 5,6. Da aber der „Selbststeuerungs“- p_{ah} des Muskels, d. h. der p_{ah} , bei dem jede weitere Milchsäurebildung aufhört, der p_{ah} = etwa 6 bis 5,5 ist (beim Frosch¹ wie beim Kaninchen²), kommt eine Säurequellung bei der Kontraktion überhaupt nicht in Frage, die wesentlich über die Alkali-quellung des ruhenden Muskels hinausgeht. Hierbei ist ganz davon abgesehen, daß die für eine etwaige Quellung maßgebliche aktive Konzentration des Myogensäuresalzes in physiologischem Salzmilieu offenbar nicht unwesentlich hinter seiner Gesamtkonzentration (Normalität) zurückbleibt (s. S. 428 ff.).

Die in der geringen Azidität des maximal gesäuerten Muskels (auf jeden Fall) liegenden Schwierigkeiten für die Säurequellungstheorie sucht O. v. Fürth³ folgendermaßen zu umgehen: Wenn der ganze Muskel durch Milchsäure ein p_{ah} auch nur von etwa 6 hat, so kann der p_{ah} an den Verkürzungsstellen doch im Verkürzungsmoment sehr viel saurer sein, indem dort eine sehr hohe Milchsäurekonzentration explosionsartig entsteht, die sich erst nachher unter Absinken der lokalen Azidität gleichmäßig über den ganzen Muskel verteilt. Die so begründete hohe Verkürzungszidität ist abzulehnen. Denn die Milchsäurebildung bestimmt nicht einfach den p_{ah} , sondern der p_{ah} gerade an den Entstehungsorten der Milchsäure bestimmt auch umgekehrt die Milchsäurebildung. Der Selbststeuerungs- p_{ah} ist der p_{ah} , bei dem das glykolytische Ferment seine glykolsierende Tätigkeit einstellt. Wenn auch die Empfindlichkeit des glykolytischen Ferments gegen Azidität intra vitam nicht ganz so groß sein sollte, als es nach den postmortalen Beobachtungen scheint, so dürften die daraus resultierenden etwaigen Verschiebungen des Selbststeuerungs- p_{ah} wohl sicher nicht genügen, die oben gezogenen Schlüsse über die Unmöglichkeit der Säurequellungstheorie zu entkräften.

Garner⁴ erwägt, daß die Muskelkontraktion bewirkt sei durch molekulare Umordnung, die bei der Entionisierung der Alkalisalze organischer Verbindungen vom Fettsäuretypus (Fettsäure, Lipoid, gewisse Proteine) auftreten kann.

¹ O. Meyerhof und K. Lohmann, diese Zeitschr. 168, 128, 1926.

² H. H. Weber, l. c.

³ Vgl. Oppenheimers Handb. d. Biochem. 8, 75ff., 2. Aufl. Jena, Gustav Fischer, 1925.

⁴ W. E. Garner, Proc. Roy. Soc. (B) 99, 40, 1925.

Eine molekulare Umordnung der Verkürzungssubstanz kann aus verschiedenen Gründen¹ die Spannungsleistung des Muskels nur dann erklären, wenn die durch die angegebene Reaktion entionisierten Moleküle eine zusammenhängende Schicht bilden. Garner hat nun berechnet, wie groß diese Schicht wäre, wenn Alkalistearate die Verkürzungssubstanz darstellten. Er fand, daß die bei der Einzelzuckung entstehende Milchsäure nur eine monomolekulare Stearatschicht von einem Zehntel der Fibrilloberfläche entionisieren könnte. Man braucht also eine Verkürzungssubstanz, von der größere Mengen durch ein Molekül Milchsäure entionisiert werden, um zu einer Schicht genügender Ausdehnung zu kommen. Garner hat deshalb auch an Proteine gedacht, da deren Äquivalentgewicht etwa viermal so hoch ist bei totaler Dissoziation wie das der Stearinsäure. Auch diese Annahme führt zu einer Oberfläche, die die Fibrillen noch nicht deckt. Dies gilt besonders, wenn man berücksichtigt, daß der Längsschnitt der an einer Valenz befindlichen Eiweißradikale nicht um ebensoviel größer sein dürfte als der von Stearinsäuremolekülen, wie es ihre Masse — nach dem Verhältnis der Äquivalentgewichte — ist. Denn beim Eiweiß sind auch die queren Durchmesser der Moleküle vermutlich größer als bei der Stearinsäure. Auf den Längsschnitt kommt es aber für die Größe der entionisierten Schicht an, da die Teilchen der Verkürzungssubstanz parallel der Faserrichtung angeordnet gedacht werden. Nun zeigt aber das Beispiel des Myogens, daß man gar nicht mit dem Äquivalentgewicht des total dissoziierten Proteins zu rechnen braucht, ja, es sogar nicht einmal darf, da die Valenzen mit einer sehr kleinen Dissoziationskonstante bei physiologischer Reaktion sicher überhaupt gar nicht dissoziiert sind. Diese können also auch nicht durch Milchsäure entionisiert werden. Hierfür kommen nur die Valenzen der ersten erkennbaren Dissoziationsstufe in Frage. Deren Äquivalentgewicht beträgt aber etwa 5000, ist also etwa 18mal so groß wie das der Stearinsäure. Wenn Komplexe dieser Größe von einem Milchsäuremolekül ihrer elektrischen Ladung beraubt werden, dürfte die Schicht, die in den entionisierten Zustand übergeht, sicher nicht kleiner sein als die Fibrilloberfläche. Dies gilt sogar dann, wenn man das Verhältnis $\frac{\text{Längsschnitt}}{\text{Masse}}$ bei dem Protein als nur halb so groß ansieht wie bei der Stearinsäure.

Nun ist es allerdings nicht gerade wahrscheinlich, daß das Myogen die Verkürzungssubstanz darstellt, da histochemische Untersuchungen Biedermanns² für seine Lokalisation im Sarkoplasma sprechen. Doch dürfte die auf der Ionisationskurve des Myogens aufgebaute Ableitung prinzipiell für alle Eiweißkörper des Muskels gelten, da alle diese Proteine polyvalente Säuren sind, bei denen mit erheblichen Unterschieden der einzelnen Dissoziationskonstanten zu rechnen ist.

Wichtiger ist folgendes: Nach Meyerhof und Lohmann³ ändert der Muskel von der Ruhe zur Ermüdung sein p_{aH} von etwa 7,3 bis etwa 6,4, wobei sich 0,4 bis 0,45 % Milchsäure bilden. Diese Milchsäure wird nach diesen und anderen Autoren zur Hälfte vom Alkaliproteinat

¹ W. E. Garner, Proc. Roy. Soc. (B) **99**, 40, 1925.

² W. Biedermann, Ergebn. d. Biol. **2**, 416, 1927.

³ l. c.

des Muskels neutralisiert, d. h. die Muskeleiweißkörper geben zu diesem Zweck in 1 g Muskel $2,5 \cdot 10^{-2}$ Millimol Alkali ab ($0,45\% = 0,05$ m Milchsäure). Der Unterschied in der Alkalibindung des Myogens beträgt für das Millimol $N = 86$ mg Myogen zwischen p_{ah} 7,3 und 6,3 etwa $0,5 \cdot 10^{-2}$, zwischen p_{ah} 7,3 und 6,4 etwa $0,4 \cdot 10^{-2}$ Millimol Alkali (s. S. 424, Abb. 3). Unter der Annahme, daß das gesamte Eiweiß des Muskels von 1 g Gewicht aus Myogen besteht, könnten diese 0,2 g Myogen 0,9 bis $1,2 \cdot 10^{-2}$ Millimol Alkali (bei einer p_{ah} -Verschiebung bis 6,4 bzw. 6,3) abgeben. Das wäre weniger als die Hälfte dessen, was die Muskeleiweißkörper in Wirklichkeit zur Milchsäureneutralisierung beitragen (s. oben). Es müssen also andere Muskelproteine (Myosin?) zwischen p_{ah} 7,3 und 6,4 eine viel höhere Pufferungspotenz besitzen als das Myogen und so die Hauptleistung bei der Milchsäureneutralisierung durch Eiweißkörper übernehmen. Sollte sich die *Biedermannsche*¹ Beobachtung bestätigen, daß das Sarkoplasma fast ganz (bis auf lipoide Einschlüsse) aus Myogen besteht, so müßte dieser Vorgang sich im wesentlichen in den Fibrillen abspielen, d. h. die *Meyerhofschen* Ermüdungsorte müßten in diesem Falle in den Fibrillen liegen.

Zusammenfassung.

1. Durch Elektrodialyse gereinigte, geeignet hergestellte Myogenlösungen enthalten 1 bis 6 % Myogen. Von dem gesamten in der Lösung enthaltenen Stickstoff stammen maximal 5 bis 10 % aus Fremdproteinen (Albumin) (vgl. allgemeiner Teil II).

2. Aus dem spezifischen Gewicht von Myogenlösungen berechnet sich das spezifische Gewicht reinen Myogens bei 20° zu 1,35. 1 g Myogen nimmt demnach in Lösung ein Volumen von 0,74 ccm ein (vgl. wie unter 1.).

3. Die spezifische Drehung frischer Myogenelektrodialysate beträgt bei CO₂-Abschluß etwa 31°. Sie steigt durch Säureionisierung bis auf etwa das Dreifache (vgl. wie unter 1.).

4. Die Diskussion der Fehler, die bei der Bestimmung der H⁺- und OH⁻-Bindungskurve auftreten können, ergibt auf Grund von Kontrollbestimmungen und rechnerischen Überlegungen: Hydrolytische Eiweißspaltung während des Versuches läßt in extrem alkalischen Lösungen die elektrotitrimetrisch ermittelte OH⁻-Bindung möglicherweise bis 20 % zu hoch erscheinen. In sehr sauren Lösungen erscheint die H⁺-Bindung durch Vernachlässigung des „nichtlösenden Raumes“ für H⁺ vielleicht um etwa 10 % zu niedrig. Sonstige Fehler sind ohne wesentlichen Einfluß. Auch mizellare *Donnan*-Gleichgewichte scheinen die

¹ l. c. Doch vgl. dazu auch *Pischinger*, Pflügers Archiv **217**, 205, 1927.

Bindungskurve — wenigstens aus HCl und NaOH — nicht wesentlich zu fälschen (vgl. allgemeiner Teil III).

5. Die H^+ - und OH^- -Bindung des Myogens wächst bei gegebenen p_{aH} geradlinig mit der Myogenkonzentration (vgl. allgemeiner Teil IV).

6. Die H^+ -Bindungskurve eines Millimols Myogenstickstoff läßt sich (abgesehen von der isoelektrischen Zone) gut durch die Dissoziationskurve einer einwertigen Base mit der Dissoziationskonstanten $K_B = 3,5 \cdot 10^{-11}$ und einem Gesamtsäurebindungsvermögen von $115 \cdot 10^{-3}$ Millimol H^+ darstellen. Das Basenäquivalentgewicht des Myogens beträgt demnach 750 (vgl. allgemeiner Teil IV).

7. Die OH^- -Bindung auf das Millimol Myogenstickstoff wird beschrieben (abgesehen von der isoelektrischen Zone) durch Addition der Dissoziationskurven zweier einwertiger Säuren mit den Dissoziationskonstanten $K_{a_1} = 6,3 \cdot 10^{-9}$ und $K_{a_2} = 10^{-11}$ und einem Gesamtbasenbindungsvermögen von 17 bzw. $89 \cdot 10^{-3}$ Millimol OH^- . Das Äquivalentgewicht der ersten erkennbaren Dissoziationsstufe ist demnach 5100, das Gesamtbasenäquivalent elektrotitrimetrisch 815, nach Willstätter-Titration 1047. Ein Mittel von 950 dürfte der Wahrheit am nächsten kommen (vgl. allgemeiner Teil IV).

8. Es wird diskutiert, welche Aussagen sich über die Aktivität einiger Myogensäuresalze aus der H^+ -Bindung machen lassen. Für Myogenchlorid in reiner HCl ergibt sich ferner nach Messungen mit der Kalomelektrode ein Anwachsen des „Aktivitätsgrades“ (siehe S. 426) von 0,5 bei p_{aH} 1,5 bis etwa 0,7 bei p_{aH} 3. In HCl + m/30 NaCl beträgt dagegen der Aktivitätsgrad bei p_{aH} 3 nur 0,4.

9. Der „nichtlösende Raum“ für H^+ beträgt für das Gramm maximal säureionisierten Myogens ungefähr 2,7 cm. Seine Kleinheit steht im Widerspruch zu dem Volumen des Myogens als disperse Phase, wie es sich aus Viskositätsmessungen berechnet (Viskositätsvolumen eines Grammes Myogen bei p_{aH} 1,5 = 12,4 cm). Diese Diskrepanz ist von allgemeinerer Bedeutung im Hinblick auf die Paulische Hydratationstheorie der Eiweißionen, die im wesentlichen auf Viskositätsmessungen beruht.

10. Die Alkaliionisation des Myogens bei dem p_{aH} des ruhenden Muskels ist ebenso hoch wie die Säureionisation bei p_{aH} 5,5, d.h. einem p_{aH} , den der Muskel infolge der p_{aH} -Selbststeuerung der Milchsäurebildung fast nie erreicht. Da das Myogen infolge seines isoelektrischen Punktes bei p_{aH} 6,3 der einzige Muskeleiweißkörper ist, der für eine Säurequellung in Frage kommt, ist demnach die Säurequellungstheorie der Kontraktion abzulehnen (vgl. allgemeiner Teil VII).

11. Wenn alles Muskeleiweiß Myogen wäre, so könnte dieses nur etwa ein Fünftel der Milchsäure neutralisieren, die bei hochgradiger Muskelermüdung entsteht. Da aber in Wirklichkeit die Hälfte bis zwei

Drittel der Milchsäure von Muskeleiweiß neutralisiert wird, muß dieses durch ein Muskelprotein von erheblich größerer Pufferkapazität geschehen, als sie das Myogen besitzt. Dies würde unter Umständen für eine Lokalisation der *Meyerhofschen* Ermüdungsorte in den Fibrillen sprechen (vgl. allgemeiner Teil VII).

Der Rockefeller Foundation bin ich für Unterstützung bei Beginn der Arbeit, der Notgemeinschaft deutscher Wissenschaft bei ihrem Abschluß zu Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil.

I. *Myogendialysate*.

A. Herstellung. Die Herstellung der Myogendialysate erfolgt wie früher¹. Als Versuchstiere wurden in *dieser* Arbeit ausschließlich Kaninchen verwandt. Abweichend ist nur die Gefäßdurchspülung mit Ringerlösung, die mit Saccharose gesättigt ist. Diese Saccharosesättigung vermindert das Durchspülungsödem recht ausgesprochen. Es empfiehlt sich ferner, bei der Dialyse des Muskelpreßsaftes die Moysin- und Myogenfibrinniederschläge mehrmals abzufiltrieren. Sie sind diffusionshindernd und Bakterien-schlupfwinkel. Bei der Elektrodialyse kamen zwei „alte“ Chromgelatinemembranen, Messing- und Platinelektrode zur Verwendung. Der Preßsaft befand sich während aller Maßnahmen, mit Ausnahme der höchstens fünfstündigen Elektrodialyse, unter Toluol. Bei der Elektrodialyse darf die Reaktion p_{aH} 6 nach der sauren Seite nicht wesentlich überschreiten, da bereits bei p_{aH} 5,5 bis 5,8 sich das Myogen als harter Belag an der Kathodenmembran niederschlägt². Trübungen werden nach der Elektrodialyse in luftdicht verschlossenen Zentrifugengläsern abzentrifugiert. Denn die spezifische Leitfähigkeit steigt sonst durch CO_2 -Aufnahme aus der Luft auf 2 bis 3 $\cdot 10^{-5}$ an.

B. Reinheit. Angaben über die spezifische Leitfähigkeit der Myogendialysate (*) finden sich in allen Tabellen. Der Betrag an Rest-N geht aus Tabelle I hervor. Daß 70° bei raschem Erwärmen die obere Fällungsgrenze für Myogen darstellt, ergab sich erneut daraus, daß die bei 70° entstehende Trübung bei p_{aH} 6,0 deutlich kathodisch, die bei weiterem Erwärmen entstehende feine Trübung dagegen anodisch wanderte. Versuch 5 bei vollständiger Enteiweißung mit Sulfosalicylsäure zeigt, daß nicht-kolloidaler Rest-N praktisch nicht vorhanden ist.

Tabelle II gibt die Veränderungen der Leitfähigkeit und des p_{aH} , die beim Erwärmen durch Myogenzersetzung entstehen. Die Erwärmung der Lösungen, die der *-Bestimmung dienten, fand auf dem Wasserbad im verschlossenen Leitfähigkeitsgefäß selbst statt, um Änderungen von * durch CO_2 -Aufnahme zu vermeiden. Die Messung fand nach genauer Wiederabkühlung statt. Unerwärmte Kontrollen zeigten in derselben Zeit keine oder fast keine Änderung von *. Die Änderung von * scheint bei diesem Verfahren zu gering, da sich auf den Elektroden beim Erwärmen

¹ l. c.

² Auch diese Tatsache zeigt, daß der isoelektrische Punkt des Myogens alkalischer als p_{aH} 6 liegt, worauf im Hinblick auf gewisse Zweifel nochmals hingewiesen sei. (Vgl. *Biedermann*, l. c.)

Tabelle I.

N-Gehalt von Myogenlösungen nach Ausfällung des Myogens.

Nr.	Art der Myogenfällung	1 ccm Myogenlösung enthält Millimol N		
		A vor der Myogenfällung	B nach der Myogenfällung	$\frac{B}{A}$
1	Erwärmen auf 70° bei p_H 6,3	0,261	0,0125	0,048
2	Ebenso	0,146	0,01	0,068
3	Erwärmen auf 100° bei p_H 6,3	0,146	0,01	0,068
4	1,2 m Na_2SO_4 bei $p_H < 4$	0,188	0,0167	0,089
5	5 ccm Myogen + 0,7 ccm 20%ige Sulfosalicylsäure	0,380	0,003	0,0078

Anmerkung: Nr. 1, 2 und 4 geben nach dem Fällen mit Sulfosalicylsäure leichte Trübung.

Tabelle II.

Änderung von κ und p_H beim Erwärmen der Myogenlösungen.

Behandlung	κ		p_H	
	vorher	nachher	vorher	nachher
3 Min auf 70°	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$2,7 \cdot 10^{-5}$	—	—
10 Min. auf 70°	1,8	3,7	—	—
10 Min. auf 70° und 5 Min. auf 100°	1,8	12,3	6,05	6,45
Nach Elektrodenreinigung . .	—	21,1	—	—
10 Min. auf 70°	1,8	4,2	—	—
Nach Elektrodenreinigung . .	—	5,7	—	—

dichte, widerstandserhöhende Niederschläge von Myogen bilden. In einigen Versuchen wurden diese entfernt, wonach sich noch beträchtlich höhere κ -Werte ergaben als vor der Reinigung. Die Reinigung geschah durch vorsichtige Entfernung des Elektrodenpaares aus dem Leitfähigkeitsgefäß, Abspritzen der Niederschläge mit einem scharfen Wasserstrahl und Nachwaschen mit Aqua dest. Einige κ -Werte nach derartiger Behandlung sind in Tabelle II mit angeführt.

C. *Spezifisches Gewicht.* Die Bestimmung des spezifischen Gewichtes erfolgte in den Versuchen 1 und 2 durch analytische Wägung eines 50-ccm-Meßkolbens, in Versuch 3 bis 5 eines 5-ccm-Pyknometers in der üblichen Weise. Die genaue Einstellung auf die Füllungsmarke erfolgte nach 15 bis 20 Minuten Aufenthalt des betreffenden Gefäßes in einem Wasserbad von 20°. Auswertung der Ergebnisse geht aus Tabelle III hervor.

D. *Spezifische Drehung.* Die Bestimmung der spezifischen Drehung erfolgte mit der Apparatur nach *Schmidt* und *Haensch* im nichtmonochromatischen Na-Licht der Lampe von *Airila* und *Komppa*. Die Elektrodialysate wurden aus den verschlossenen Zentrifugengläsern unmittelbar in die Polarisationsröhre gegeben. Trotz raschesten Arbeitens ist die Ablesegenauigkeit nicht so sehr hoch, da isoelektrische Dialysate sich sehr rasch verschleiern und dadurch viel Licht absorbieren. Es mußte infolgedessen meist eine 0,5-D-Röhre verwandt werden. Die unter α_D angeführten Werte wurden also im allgemeinen nur halb so hoch abgelesen, wie sie in Tabelle IV angeführt sind. Sie sind also sehr klein. In stärker ionisierten Lösungen (Nr. 7e, 8) fallen diese Schwierigkeiten fort.

Tabelle III.
Dichte von Myogen und Myogenlösung bei 20°.

Nr.	Myogenlösung		Myogen			Eigenvolumen des Myogens pro g Myogen 1/spez. Gew.
	Spez. Gew. bei 20°	g Myogen in 100 cem Lösung	Die Myogenlösung enthält		Spez. Gew. bei 20° g/cem Myogen	
			$\frac{\text{cem H}_2\text{O}}{\text{g Lösung} - \text{g Myogen}}$ 0,998 23	$\frac{\text{cem Myogen}}{\text{cem Lösung} - \text{cem H}_2\text{O}}$		
1	1,00316	2,056	$\frac{50,0726 - 1,028}{0,998\ 23} = 49,132$	$49,915 - 49,132 = 0,783$	$\frac{1,028}{0,783} = 1,31$	0,76
2	1,0068	3,176	$\frac{50,2575 - 1,588}{0,998\ 23} = 48,755$	$49,915 - 48,755 = 1,160$	$\frac{1,588}{1,168} = 1,37$	0,73
3	1,0024	1,636	$\frac{5,0340 - 0,0818}{0,998\ 23} = 4,961$	$5,0220 - 4,961 = 0,061$	$\frac{0,0818}{0,061} = 1,34$	0,745
4	1,0024	1,490	$\frac{5,0340 - 0,0715}{0,998\ 23} = 4,9683$	$5,0220 - 4,9683 = 0,0537$	$\frac{0,0745}{0,0537} = 1,385$	0,725
5	1,0038	2,246	$\frac{5,0412 - 0,1123}{0,998\ 23} = 4,9376$	$5,0220 - 4,9376 = 0,0844$	$\frac{1,123}{0,0844} = 1,33$	0,75
Mittelwert:					1,35	0,74

Tabelle IV. Spezifische Drehung frischer Myogenelektrodialysate.

Nr.	Stammlösung		% Myogen	p_H	α_D	$[\alpha]_D^{18}$	Bemerkungen
	Dialysen- dauer Tage	x					
1	?	$7,5 \cdot 10^{-6}$	1,845	?	0,558	30,3	Reines Elektrodialysat
2	6	$1,7 \cdot 10^{-6}$	1,47	5,9	0,482	32,8	
3	3	1,7	2,24	6,0	0,712	31,5	
4	7		3,45	6,3	1,121	32,4	
5	5	1,3	1,98	5,9	0,618	31,2	
6	7	1,3	3,53	6,0	1,144	32,3	
7a	3	1,0	0,98	5,5	0,320	32,8	Elektrodialysat + HCl (Gesamt-HCl = $n/2000$)
7b	3	1,0	0,98	5,9	0,295	30,1	Elektrodialysat + H_2O
7c	3	1,0	0,98	6,4	0,290	29,6	Elektrodialysat + NaOH (Gesamt-NaOH = $n/2000$)
7d	3	1,0	0,98	7,05	0,312	31,8	Elektrodialysat + NaOH (Gesamt-NaOH = $n/1000$)
7e	3	1,0	1,08	3,15	1,198	66,6	Elektrodialysat + HCl (Gesamt-HCl = $1,84 \cdot 10^{-2}$)
8	6	1,3	2,33	3,02	1,698	72,8	Elektrodialysat + HCl (Gesamt-HCl = $2,41 \cdot 10^{-2}$)

II. Die H^- - und OH^- -Bindung.

A. Die elektromotorische p_{ah} -Bestimmung erfolgte genau mit der zuletzt angegebenen Apparatur und Versuchsanordnung von Michaelis¹.

Tabelle V. H^- -Aktivität.

Nr.	T	gegen Standard- acetat	p_{ah}	a_h	$[H]$	f_a	Art der Säure
1	18 ⁰	— 207,6	0,997	$1,007 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-1}$	1,007	HCl
2	18	— 207,7	0,995	$1,012 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-1}$	1,012	
3	21	— 210,0	1,002	$0,994 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-1}$	0,994	HCl
4	21	— 210,2	0,997	$1,007 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-1}$	1,007	
5	23	— 152,7	2,006	$0,985 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	0,985	HCl
6	23	— 152,8	2,004	$0,99 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	0,990	
7	20	— 91,7	3,029	$0,934 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,934	HCl
8	20	— 91,75	3,028	$0,935 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,935	HCl in m/22 NaCl
9	20	— 92,05	3,023	$0,946 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,946	
10	18,5	— 148,5	2,036	$0,919 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	0,919	H_2SO_4
11	18,5	— 148,6	2,033	$0,926 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	0,926	
12	17	— 148,5	2,025	$0,942 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	0,942	H_2SO_4
13	17	— 148,6	2,023	$0,946 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	0,946	
14	20	— 91,4	3,035	$0,921 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,921	H_2SO_4
15	20	— 91,1	3,039	$0,913 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,913	
16	20	— 91,4	3,035	$0,921 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,921	H_2SO_4
17	20	— 91,1	3,039	$0,913 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,913	

¹ L. Michaelis und K. Kakinuma, l. c.

Tabelle III.
Dichte von Myogen und Myogenlösung bei 20°.

Nr.	Myogenlösung		Myogen			Spez. Gew. bei 20 ^o g/ccm Myogen	Eigenvolumen des Myogens pro g Myogen 1/spez. Gew.
	Spez. Gew. bei 20 ^o	g Myogen in 100 ccm Lösung	Die Myogenlösung enthält		Spez. Gew. bei 20 ^o g/ccm Myogen		
			$\frac{\text{ccm H}_2\text{O}}{\text{g Lösung} - \text{g Myogen}}$ 0,998 23	$\frac{\text{ccm Myogen}}{\text{ccm Lösung} - \text{ccm H}_2\text{O}}$			
1	1,00316	2,056	$\frac{50,0726 - 1,028}{0,998\ 23} = 49,132$	49,915 — 49,132 = 0,783	$\frac{1,028}{0,783} = 1,31$	0,76	
2	1,0068	3,176	$\frac{50,2575 - 1,588}{0,998\ 23} = 48,755$	49,915 — 48,755 = 1,160	$\frac{1,588}{1,168} = 1,37$	0,73	
3	1,0024	1,636	$\frac{5,0340 - 0,0818}{0,998\ 23} = 4,961$	5,0220 — 4,961 = 0,061	$\frac{0,0818}{0,061} = 1,34$	0,745	
4	1,0024	1,490	$\frac{5,0340 - 0,0715}{0,998\ 23} = 4,9683$	5,0220 — 4,9683 = 0,0537	$\frac{0,0745}{0,0537} = 1,385$	0,725	
5	1,0038	2,246	$\frac{5,0412 - 0,1123}{0,998\ 23} = 4,9376$	5,0220 — 4,9376 = 0,0844	$\frac{1,123}{0,0844} = 1,33$	0,75	
Mittelwert:					1,35	0,74	

Myogenstammlösung						
Nr.	Dialyse			Millimol N ccm	pH	Bezugselektrode
	Dauer	Art	κ			
1	13 Tage	gewöhnlich	$5 \cdot 10^{-5}$	0,26	6,3	Standardacetat
2						"
3						"
4	17 Tage	gewöhnlich	$3 \cdot 10^{-5}$	0,146	6,3	"
5	?	gewöhnlich und elektrisch	$1,5 \cdot 10^{-5}$	0,253	6,2	kolorimetrisch
6						"
7						"
8						"
9						Standardacetat
10						"
11						"
12	?	gewöhnlich und elektrisch	$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,194	6,2	"
13	?	gewöhnlich und elektrisch	$1,5 \cdot 10^{-5}$	0,246	6,6	kolorimetrisch
14						"
15						Standardacetat
16						"
17						"
18						"
19	21 Tage	gewöhnlich und elektrisch	$1,4 \cdot 10^{-5}$	0,168	?	"
20						"
21						"
22	4 Tage	gewöhnlich und elektrisch	$1,1 \cdot 10^{-5}$	0,464	?	"
23						"
24	3 Tage	gewöhnlich und elektrisch	$9,4 \cdot 10^{-6}$	0,24	6,0	"
25	?	gewöhnlich und elektrisch	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,370	?	"
25a						"
26	7 Tage	gewöhnlich und elektrisch	$9 \cdot 10^{-6}$	0,40	6,3	"
26a						"

Die Versuche Nr. 1 und 4 und Nr. 22 und 23 sind zu Abb. 2 verwandt.

I.

ogen aus HCl.

	H ⁺ -Bindung				
pH	1 ccm des Myogen-Säuregemisches enthält Millimol				Geb. Millimol H ⁺
	H ⁺ zugeführt	H ⁺ frei	H ⁺ gebunden	N	Millimol N
5,77	3,333 · 10 ⁻³	0,017 · 10 ⁻³	3,316 · 10 ⁻³	0,217	15 · 10 ⁻³
5,21	5,715	0,061	5,654	0,186	30
4,46	10,0	0,35	9,65	0,130	74
3,75	1,855	0,018	1,837	0,133	14
2,95	0,538	0,001	0,537	0,194	2,8
2,75	0,857	0,002	0,855	0,180	4,8
2,5	1,132	0,003	1,129	0,168	6,7
2,3	1,375	0,005	1,370	0,158	8,1
2,33	9,67	0,14	9,53	0,168	53
2,318	14,43	0,48	13,95	0,168	77
2,135	28,7	7,3	21,4	0,168	118
1,408	5,77	0,08	5,69	0,140	41
1,15	0,238	0,0007	0,238	0,176	1,4
1,57	0,954	0,002	0,952	0,176	5,4
1,51	2,38	0,004	2,38	0,176	13,5
1,42	5,24	0,063	5,18	0,176	30
1,286	18,57	1,378	17,19	0,176	98
1,212	28,1	7,57	20,5	0,176	117
1,337	9,00	0,426	8,57	0,12	72
1,284	13,85	1,45	12,4	0,12	103
1,1845	28,15	14,29	13,86	0,12	115
1,586 ⁺	50,0	25,9	24,1	0,209	115
1,247 ⁺	100,0	53,2	46,8	0,418	111,5
1,487	57,7	32,5	25,2	0,226	111,2
1,151	107,1	70,4	36,7	0,33	111,5
1,471	53,55	33,81	19,74	0,165	119,5
1,344	83,3	45,3	38,0	0,333	114
1,662	41,65	21,77	19,88	0,1665	119

r. 25 bis 26a liegen der Tabelle über den „nichtlössenden Raum“ zugrunde.

den Differenzen zwischen kolorimetrischer und elektromotorischer Bestimmung nicht um Fehler der elektrischen Methode durch Myogenfibrinbildung an den Elektroden handelt (Einstellung von ζ -Potentialen), geht aus dem Vergleich von Versuch 2 und 2a hervor. Wollte man nämlich das kolorimetrische Ergebnis als richtig ansehen, so müßte das Myogen aus dem stark puffernden Acetatgemisch etwa 12mal mehr H^+ gebunden haben als aus der HCl .

B. Die Tabellen VII bis X bringen die Befunde über die H^+ - und OH^+ -Bindung des Myogens, die mit der angegebenen Methode erhoben wurden. Als zugesetzte H^+ und OH^+ auf den Kubikzentimeter Myogenlösung ist die tatsächlich zugesetzte Menge $\mp$ der Menge angeführt, die nötig war, um den Kubikzentimeter der Myogenlösung von ihrem „zufälligen“ p_{ah} auf 6,3 (den p_{ah} des isoelektrischen Punktes) zu bringen. Den Versuchen 26 bis 27a der Tabelle VII, die den Berechnungen über den „nichtlösenden“ Raum dienen, liegen Doppelmessungen zugrunde, die keine größere Differenz als 0,1 Millivolt aufweisen. Die Ansätze 26a bis 27a sind aus 26 und 27 durch genaue Verdünnung eines aliquoten Teiles mit Leitfähigkeitswasser auf das Doppelte hergestellt. Ursprünglicher und verdünnter Ansatz wurden gleichzeitig gemessen. Die Messung des Myogens mit den Säuren fand in früher beschriebener Weise so statt, daß keine Trübungen entstanden (bis auf eine Ausnahme in Tabelle XII, vgl. S. 449).

HCl und H_2SO_4 der Ansätze sind Normalsäuren von *Kahlbaum*, die $NaCl$ -Lösungen wurden aus geglühtem $NaCl$ zur Analyse hergestellt und durch Titration nach *Volhard* als richtig in ihrer Konzentration bestätigt. $HSCN$ wurde aus reinem $KSCN$ + Phosphorpentoxyd durch konzentrierte H_2SO_4 bei 0° bis $+1^\circ$ vertrieben und bei -15° bis 20° in einer Vorlage kondensiert. Er ergab azidimetrisch und nach *Volhard* den gleichen Titer und zeigte in 0,2 Normalität mit $FeSO_4$ keine Spur einer Rotfärbung, war also frei von Persulfosäure.

In der Tabelle VIIa sind einige Versuche der Tabelle VII unter Berücksichtigung des „nichtlösenden Raumes“ korrigiert. Der Faktor 2,7, mit dem die Gramme des Myogens in Kubikzentimetern zu multiplizieren sind, um auf den „nichtlösenden Raum“ zu kommen, entstammt Tabelle II des allgemeinen Teiles. Die C_H , durch deren Multiplikation mit dem „lösenden Raum“ sich die Millimol H^+ im Kubikzentimeter der Säureeweißmischung

Tabelle VIIa.

Korrektur der H^+ -Bindung unter Berücksichtigung des „nichtlösenden Raumes“.

Zu den Versuchsnummern der Tabelle 7	p_{ah}	1 ccm der Myogensäuremischung enthält				Geb. Millimol H^+ Millimol N	
		g Myogen	nicht-lösenden Raum = g Myogen . 2,7	Millimol H^+ = $C_H \cdot (1 - \text{nicht-lösenden Raum})$	H^+ geb.	korrigiert	unkorrigiert
18	2,12	0,0151	0,041	$7,26 \cdot 10^{-3}$	$20,8 \cdot 10^{-3}$	$118 \cdot 10^{-3}$	$117 \cdot 10^{-3}$
21	1,845	0,0103	0,028	13,9	14,25	119	115
26 a	1,662	0,0144	0,039	20,9	20,75	124	119
25 a	1,471	0,0142	0,038	33,25	20,3	123	119,5
26	1,344	0,0287	0,0775	41,8	41,5	124	114
25	1,151	0,0284	0,0767	65,0	42,1	127	111,5

VII.

Myogen aus HCl.

H ⁺ -Bindung					
p _H	1 ccm des Myogen-Säuregemisches enthält Millimol				Geb. Millimol H ⁺
	H ⁺ zugeführt	H ⁺ frei	H ⁺ gebunden	N	Millimol N
4,77	3,333 · 10 ⁻³	0,017 · 10 ⁻³	3,316 · 10 ⁻³	0,217	15 · 10 ⁻³
4,21	5,715	0,061	5,654	0,186	30
3,46	10,0	0,35	9,65	0,130	74
4,75	1,855	0,018	1,837	0,133	14
5,95	0,538	0,001	0,537	0,194	2,8
5,75	0,857	0,002	0,855	0,180	4,8
5,5	1,132	0,003	1,129	0,168	6,7
5,3	1,375	0,005	1,370	0,158	8,1
3,83	9,67	0,14	9,53	0,168	53
3,318	14,43	0,48	13,95	0,168	77
2,135	28,7	7,3	21,4	0,168	118
4,08	5,77	0,08	5,69	0,140	41
6,15	0,238	0,0007	0,238	0,176	1,4
5,7	0,954	0,002	0,952	0,176	5,4
5,1	2,38	0,004	2,38	0,176	13,5
4,2	5,24	0,063	5,18	0,176	30
2,86	18,57	1,378	17,19	0,176	98
2,12	28,1	7,57	20,5	0,176	117
3,37	9,00	0,426	8,57	0,12	72
2,84	13,85	1,45	12,4	0,12	103
1,845	28,15	14,29	13,86	0,12	115
1,586 ⁺	50,0	25,9	24,1	0,209	115
1,247 ⁺	100,0	53,2	46,8	0,418	111,5
1,487	57,7	32,5	25,2	0,226	111,2
1,151	107,1	70,4	36,7	0,33	111,5
1,471	53,55	33,81	19,74	0,165	119,5
1,344	83,3	45,3	38,0	0,333	114
1,662	41,65	21,77	19,88	0,1665	119

r. 25 bis 26 a liegen der Tabelle über den „nichtlösenden Raum“ zugrunde.

den Differenzen zwischen kolorimetrischer und elektromotorischer Bestimmung nicht um Fehler der elektrischen Methode durch Myogenfibrinbildung an den Elektroden handelt (Einstellung von ζ -Potentialen), geht aus dem Vergleich von Versuch 2 und 2a hervor. Wollte man nämlich das kolorimetrische Ergebnis als richtig ansehen, so müßte das Myogen aus dem stark puffernden Acetatgemisch etwa 12mal mehr H^+ gebunden haben als aus der HCl .

B. Die Tabellen VII bis X bringen die Befunde über die H^+ - und OH^+ -Bindung des Myogens, die mit der angegebenen Methode erhoben wurden. Als zugesetzte H^+ und OH^+ auf den Kubikzentimeter Myogenlösung ist die tatsächlich zugesetzte Menge $\mp$ der Menge angeführt, die nötig war, um den Kubikzentimeter der Myogenlösung von ihrem „zufälligen“ p_{ah} auf 6,3 (den p_{ah} des isoelektrischen Punktes) zu bringen. Den Versuchen 26 bis 27a der Tabelle VII, die den Berechnungen über den „nichtlösenden“ Raum dienen, liegen Doppelmessungen zugrunde, die keine größere Differenz als 0,1 Millivolt aufweisen. Die Ansätze 26a bis 27a sind aus 26 und 27 durch genaue Verdünnung eines aliquoten Teiles mit Leitfähigkeitswasser auf das Doppelte hergestellt. Ursprünglicher und verdünnter Ansatz wurden gleichzeitig gemessen. Die Messung des Myogens mit den Säuren fand in früher beschriebener Weise so statt, daß keine Trübungen entstanden (bis auf eine Ausnahme in Tabelle XII, vgl. S. 449).

HCl und H_2SO_4 der Ansätze sind Normalsäuren von Kahlbaum, die $NaCl$ -Lösungen wurden aus geglühtem $NaCl$ zur Analyse hergestellt und durch Titration nach Volhard als richtig in ihrer Konzentration bestätigt. $HSCN$ wurde aus reinem $KSCN$ + Phosphorpentoxyd durch konzentrierte H_2SO_4 bei 0° bis $+1^\circ$ vertrieben und bei -15° bis 20° in einer Vorlage kondensiert. Er ergab azidimetrisch und nach Volhard den gleichen Titer und zeigte in 0,2 Normalität mit $FeSO_4$ keine Spur einer Rotfärbung, war also frei von Persulfosäure.

In der Tabelle VIIa sind einige Versuche der Tabelle VII unter Berücksichtigung des „nichtlösenden Raumes“ korrigiert. Der Faktor 2,7, mit dem die Gramme des Myogens in Kubikzentimetern zu multiplizieren sind, um auf den „nichtlösenden Raum“ zu kommen, entstammt Tabelle II des allgemeinen Teiles. Die C_H , durch deren Multiplikation mit dem „lösenden Raum“ sich die Millimol H^+ im Kubikzentimeter der Säureeweißmischung

Tabelle VIIa.

Korrektur der H^+ -Bindung unter Berücksichtigung des „nichtlösenden Raumes“.

Zu den Versuchs- num- mern der Tabelle 7	p_{ah}	1 ccm der Myogensäuremischung enthält				Geb. Millimol H^+ Millimol N	
		g Myogen	nicht- lösenden Raum = g Myogen . 2,7	Millimol H^+ = $c_H \cdot (1 - \text{nicht-lösendenRaum})$	H^+ geb.	korrigiert	unkorrigiert
18	2,12	0,0151	0,041	$7,26 \cdot 10^{-3}$	$20,8 \cdot 10^{-3}$	$118 \cdot 10^{-3}$	$117 \cdot 10^{-3}$
21	1,845	0,0103	0,028	13,9	14,25	119	115
26 a	1,662	0,0144	0,039	20,9	20,75	124	119
25 a	1,471	0,0142	0,038	33,25	20,3	123	119,5
26	1,344	0,0287	0,0775	41,8	41,5	124	114
25	1,151	0,0284	0,0767	65,0	42,1	127	111,5

Myogen aus NaOH.

OH'-Bindung					
pH	1 ccm des Myogen-Na OH-Gemisches enthält Millimol				geb. Millimol OH' Millimol N
	OH' zugeführt	OH' frei	OH' gebunden	N	
4,5	0,119 · 10 ⁻³	0,000 03 · 10 ⁻³	0,119 · 10 ⁻³	0,176	0,7 · 10 ⁻³
6	0,476	0,000 04	0,476	0,176	2,7
5,5	0,475		0,475	0,154	2,9
8,8	1,30	0,00 ...	1,30	0,316	3,2
7,2	1,53	0,00 ...	1,53	0,301	5,1
7,4	2,12	0,00 ...	2,12	0,875	7,7
9,97	6,41	0,08	6,33	0,875	23
1,09	20,0	1,02	19,00	0,321	59
1,919	33,5	6,91	26,6	0,275	97
2,354	43,7	18,8	24,9	0,2405	103
7,05	0,57	0,00 ...	0,57	0,152	3,74
7,4	0,92	0,00 ...	0,92	0,145	6,3
9,65	2,99	0,04	2,95	0,133	22,2
9,82	3,45	0,06	3,39	0,124	27,3
6,6	1,00	0,00 ...	1,00	0,492	2,03
7,4	2,34	0,00 ...	2,34	0,418	5,6
8,5	4,50	0,002 6	4,5	0,369	12,2
9,12	6,57	0,01	6,56	0,421	15,6
0,44	20,2	0,23	20,00	0,492	41
1,921	43,8	6,94	36,9	0,369	100
7,4	3,14	0,00 ...	3,14	0,502	6,25
8,88	4,85	0,007	4,84	0,377	12,8
9,34	6,97	0,002	6,95	0,431	16,1
0,38	20,65	0,23	20,42	0,502	40,7
1,667	44,1	4,5	39,6	0,377	105
7,1	1,45	0,00 ...	1,45	0,268	5,4
7,35	2,04	0,00 ...	2,04	0,846	8,3
8,15	1,67	0,00 ...	1,67	0,193	8,7
8,77	2,31	0,01	2,30	0,178	12,9

von der Proteinkonzentration verwandt.

ergibt, ist der Spalte „H' frei“ der Tabelle VII entnommen. „H' geb.“ der Tabelle VIIa ist berechnet als Differenz „H' zugeführt“ der Tabelle VII und Millimol H' der Tabelle VIIa. Der Vergleich der Millimol H', die von einem Millimol N gebunden sind, in korrigiertem und unkorrigiertem Wert zeigt, daß der Betrag der Korrektur mit steigender Eiweißkonzentration und fallendem p_{ah} zunimmt, daß er aber selbst unter extremsten Bedingungen 10 bis 15% nie überschreitet und überhaupt erst bei einem $p_{ah} < 2$ merklich wird. Die Tatsache, daß zwischen p_{ah} 1,15 und 1,7 die korrigierten Werte für $\frac{\text{geb. Millimol H'}}{\text{Millimol N}}$ außerordentlich viel weniger streuen

als die unkorrigierten, bekräftigt die Richtigkeit des Faktors für den „nicht-lösenden Raum“, der ja auf einem ganz anderen Wege gewonnen ist.

Kohlensäurefreie NaOH nach Sørensen war zur Herstellung der Ansätze der Tabelle X in n/1, n/10, n/50 und n/100 Konzentrationen in Wulffschen Flaschen vorrätig und gab in keiner Konzentration mit Ba(OH)₂ auch nur einen Hauch von Trübung. Die Mischung mit dem Myogen geschah in folgender Weise: Das Myogen wurde aus den verschlossenen Zentrifugengläsern in Wägegläsern mit eingeschliffenem Deckel (bei angehaltenem Atmen, Atmungs-CO₂) einpipettiert, deren Volumen nur ganz wenig größer war als das Volumen der herzustellenden Mischung. Dann wurde aus den auf den NaOH-Flaschen montierten Mikrobüretten die nötige Menge Lauge hinzugegeben und mit verschlossenem Deckel umgeschüttelt. Schließlich wurde die Mischung vom Boden des Wägegläschens in die Birnenelektroden eingesaugt. Analog behandelte reine NaOH gab auch nach Entleerung aus dem Elektrodenkörper (nicht aber aus dem mit der Luft kommunizierenden unteren Rohre der Elektrode) mit Ba(OH)₂ keine Trübung.

C. Willstätter-Titration. Die Willstätter-Titration erfolgte in der kürzlich¹ für saure Caseinlösungen beschriebenen Weise. Selbst dann flockt das labile Myogen, besonders in konzentrierter Lösung leicht, wodurch der Laugenverbrauch leicht zu niedrig erscheint. Die angeführten Äquivalentgewichte sind also Maximalwerte.

Tabelle XI.

Basenäquivalentgewicht nach Willstätter-Titration.

Nr.	Myogenelektrodialysat		Laugenverbrauch		Äquivalentgewicht
	α	Millimol N 5 ccm	ccm 0,2 n KOH 5 ccm	10 ⁻³ Millimol KOH Millimol N	
1	1,7 · 10 ⁻⁶	0,854	0,4	93,7	918
2	1,7	1,3	0,55	85	1012
3	1,1	1,9	0,67	71	1210
Durchschnitt:				83	1050

III. Cl'-Messungen.

Die angegebenen Cl'-Potentiale beruhen auf Doppelbestimmungen. Deren Abweichungen voneinander sind in sehr sauren Lösungen etwa fünfmal so groß wie diejenigen von H'-Doppelbestimmungen. Sie betrugen

¹ H. H. Weber und H. Gesenius, diese Zeitschr. 187, 410, 1927.

X.
Myogen aus NaOH.

OH'-Bindung					
pH	1 ccm des Myogen-NaOH-Gemisches enthält Millimol				geb. Millimol OH'
	OH' zugeführt	OH' frei	OH' gebunden	N	Millimol N
6,45	0,119 · 10 ⁻³	0,000 03 · 10 ⁻³	0,119 · 10 ⁻³	0,176	0,7 · 10 ⁻³
6,6	0,476	0,000 04	0,476	0,176	2,7
6,5	0,475		0,475	0,154	2,9
6,8	1,30	0,00 ...	1,30	0,316	3,2
7,2	1,53	0,00 ...	1,53	0,301	5,1
7,4	2,12	0,00 ...	2,12	0,875	7,7
9,97	6,41	0,08	6,33	0,875	23
11,09	20,0	1,02	19,00	0,321	59
11,919	33,5	6,91	26,6	0,275	97
12,354	43,7	18,8	24,9	0,2405	103
7,05	0,57	0,00 ...	0,57	0,152	3,74
7,4	0,92	0,00 ...	0,92	0,145	6,3
9,65	2,99	0,04	2,95	0,133	22,2
9,82	3,45	0,06	3,39	0,124	27,3
6,6	1,00	0,00 ...	1,00	0,492	2,03
7,4	2,34	0,00 ...	2,34	0,418	5,6
8,5	4,50	0,002 6	4,5	0,369	12,2
9,12	6,57	0,01	6,56	0,421	15,6
10,44	20,2	0,23	20,00	0,492	41
11,921	43,8	6,94	36,9	0,369	100
7,4	3,14	0,00 ...	3,14	0,502	6,25
8,88	4,85	0,007	4,84	0,377	12,8
9,34	6,97	0,002	6,95	0,431	16,1
10,38	20,65	0,23	20,42	0,502	40,7
11,667	44,1	4,5	39,6	0,377	105
7,1	1,45	0,00 ...	1,45	0,268	5,4
7,35	2,04	0,00 ...	2,04	0,846	8,3
8,15	1,67	0,00 ...	1,67	0,193	8,7
8,77	2,31	0,01	2,30	0,178	12,9

von der Proteinkonzentration verwandt.

1,2, 0,0 2,7, 1,3, 3,0, 2,3, 0,5, 1,0, 0,3, 1,1 Millivolt in den verschiedenen Messungen. Da nach zahlreichen Kontrollen Cl' -Messungen bei hoher Azidität noch viel stärker unter dem Einfluß von Diffusionspotentialen leiden als H' -Messungen — wahrscheinlich infolge des anderen Baues der Elektroden —, wurde ihr Ausflußrohr zunächst in ein kleines Becherglas geführt, das die zu untersuchende Lösung aber mit KCl gesättigt enthielt. Erst von dort aus wurde die Verbindung mit der KCl -Wanne hergestellt. Die Potentiale blieben so tagelang konstant, es drang also kein KCl in das Innere der Kalomelelektroden. Es wurden Makroelektroden nach *Michaelis* verwendet. Der Hahn des Ausflußrohres wurde über Nacht geschlossen. Da vollkommene Erschütterungsfreiheit der Elektroden für Konstanz der Potentiale sehr wichtig ist, war jede Elektrode *dauernd* an einem langen Draht angeschlossen, und die Umschaltung von einer Elektrode auf die andere bei der Messung wurde am anderen Ende dieser Drähte vorgenommen.

Die Messung gegen die in Tabelle XII mitangeführten Bezugs Elektroden erfolgte unmittelbar, nicht wie bei der H' -Messung zweizeitig unter Vermittlung von Standardacetat. Der Messungsbereich erstreckt sich von p_{aH} 3,2 nach der sauren Seite, da bei alkalischer Reaktion die $[\text{Cl}]$ durch Bildung von Myogenkalomelsalzen zu hoch erscheint¹ (vgl. Nr. 6 der Tabelle). Bei p_{aH} 3,186 wird dieser Fehler bereits belanglos, wie aus Vergleich von Nr. 5 und 5a hervorgeht. Nr. 5 ist unkorrigiert, 5a derselbe Versuch nach dem Ergebnis von Nr. 6 korrigiert.

Die Elektrolytlösungen sind dieselben wie oben (s. S. 444).

IV. Viskositätsmessung.

Die Viskositätsmessung (s. S. 432) erfolgte im *Ostwaldschen* Viskosimeter (5 ccm Füllung) im Wasserbad von 19°.

¹ Vgl. *W. Pauli* und *Th. Oryng*, diese Zeitschr. **76**, 373, 1915.

Über den Einfluß der Alkalizufuhr auf die alimentäre Glykämie im Hungerzustand.

Von
Gertrud Hirsch.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.)

(Eingegangen am 15. August 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Bereits 1913 fand *Elias* (1), daß, wenn er Kaninchen mit Glucose und Säure per os fütterte, die mit Säure behandelten Tiere nur ganz geringe Glykogenmengen in der Leber zu speichern vermochten im Gegensatz zu den Kontrolltieren, die nur Glucose, aber keine Säure erhalten hatten. Bei Kontrollversuchen mit nur mehreren Säuregaben fand er eine Glykogenmobilisierung, Glykosurie und Hyperglykämie. Die Versuche an Kaninchen mit Säure und Glucose ergaben eine stärkere Glykosurie als die Vorversuche, die mit derselben Dosis Glucose ohne Säuregabe angestellt waren. Aus seinen Versuchen schließt *Elias*, daß das Mehr des ausgeschiedenen Zuckers auf Rechnung des durch Säure mobilisierten Zuckers aus dem Glykogen der Leber zu setzen ist. — Er faßt diese Erscheinungen: die Hyperglykämie, die Glykosurie und die Glykogenmobilisierung infolge der Säurewirkung unter dem Namen: „Säurediabetes“ zusammen.

Glykosurien nach intravenösen oder peroralen Gaben von Mineralsäuren und organischen Säuren haben schon *Naunyn*, *Frerichs*, *Pavy*, *Kueltz* und *Goltz* (2) im letzten Drittel des 19. Jahrhunderts beschrieben. Eine Bestätigung der Annahme, daß die Säuren den Glykogenabbau in der Leber bewirken, fand *Paul Ehrlich* (3), der folgende Versuche machte: Er legte Frösche einmal in saure, einmal in alkalische Zuckerlösung. Dabei stellte er fest, daß es bei den Fröschen unter saurer Lösung zu einem Glykogenabbau, bei denen unter alkalischer Lösung zu einem Glykogenaufbau kam. Ferner sah *Elias* (1) bei Durchspülungsversuchen an isolierten Schildkrötenlebern, daß der mit saurer Ringerlösung durchspülte Leberlappen Glykogen abbaute, der mit alkalischer Lösung durchspülte Glykogen ansetzte.

Elias Befunde bezüglich des Säurediabetes beim Kaninchen wurden von *Underhill* und *Murlin* (4) und *E. Lesser* (5) bestätigt. Beim Hunde fand *Elias* nach peroraler Säurezufuhr einen geringen Anstieg des Blut-

zuckers, während *Torrez* (6) bei Hunden nach intravenöser Säurezufuhr, bei normalen sowohl, als auch bei kohlehydratgemästeten Tieren, keine Blutzuckererhöhung, sondern im Gegenteil im Verlauf von 2 Stunden nach den Injektionen eine starke Hypoglykämie fand. *Bertram* (7) bestätigte diese Versuchsergebnisse, fügt aber hinzu, daß er bei ganz jungen Hunden den gleichen Säurediabetes hervorrufen konnte wie *Elias* bei seinen Kaninchen. Er versucht das verschiedene Verhalten bei Pflanzen- und Fleischfressern so zu erklären, daß einmal die Karnivoren rasch mit Hilfe des NH_3 aus dem Harnstoff der Leber die Säuren zu neutralisieren vermögen, was bei den Herbivoren nicht der Fall ist, und zweitens sich die Einstellung auf die normale Blutreaktion nach der Säurezufuhr auch rascher vollzieht, weil bei ihnen der Flüssigkeitsaustausch zwischen Blut und Geweben lebhafter und schneller vor sich geht als bei den Pflanzenfressern.

Die Säure-Glucoseversuche von *Elias* konnte *Bertram* (8) voll beim Hunde bestätigen. Er fand die alimentäre Hyperglykämie nach intravenöser Salzsäurezufuhr gegenüber der Norm wesentlich erhöht. Für eine Herabsetzung der alimentären Hyperglykämie nach Alkalizufuhr (NaHCO_3) konnte er aber keine eindeutigen Versuchsergebnisse bringen. Eine Alkaliwirkung auf den Blutzucker des erwachsenen Hundes ist nicht vorhanden. Das zeigt *Sergios Serefis* (9) bei der Adrenalinhyperglykämie, dagegen hemmt Alkalizufuhr die Adrenalinzuckerwirkung beim jungen Hunde.

Weitere Beiträge zum Kapitel Säurediabetes bringen *Fujimaki* (10), *Koehler* (11) und *Bertram* (12).

Eine bedeutsame Rolle bei der Frage der Zuckertoleranz spielt die Diät, sowohl die Art als auch die Menge der Nahrung. Eiweiß-Fettdiät setzt die Zuckertoleranz herab, Kohlehydratdiät erhöht sie [*Bertram* (13)]. *Staub* (14) zeigte bereits 1921 diese Tatsache an Versuchen, die er an Menschen anstellte, und erklärte sie durch „Bahnungsvorgänge“ im Organismus.

Bezüglich der Nahrungsmenge hat schon 1890 *F. Hofmeister* (15) beobachtet, daß hungernde Hunde nach Fütterung von Kohlehydraten Zucker ausscheiden bei KH-Mengen, die normale Hunde ohne weiteres, bewältigen. *Hoppe-Seyler* (16) spricht von einer „Vaganten-Glykosurie“, die dem unfreiwilligen Fasten der Landstreicher zuzuschreiben ist. *Staub* (17) fand nach Traubenzuckergabe von 20 bis 100 g bei einem gut genährten Manne 30 bis 50 % Hyperglykämie, bei einem Manne, der 3 Tage gehungert hatte, 243 % Hyperglykämie. *Du Vigneaud* und *Karr* (18) haben mit Kaninchen gearbeitet und erweitern *Staubs* Befunde. *Bornstein* und *Holm* (19) machten ihre Versuche an Menschen und stellten fest, daß, wenn man nach zwölfstündigem Hungern 100 g Traubenzucker zuführt, der Blutzucker weniger ansteigt, wenn dem Fasten eine Kohlehydratmahlzeit voranging, als wenn man vorher eine Fett-Eiweißdiät gab. Entsprechende Versuchsergebnisse erzielten *Bang* (20) und *Gunnar Boe* (21) an Kaninchen, *Barrenscheen* (21) an überlebenden durchbluteten Kaninchenlebern (schlechtere Glykogensynthese der Hungerleber), *Rietschel* (21) und *Lindberg* (21) an Säuglingen und *Bergmark* (21) an Erwachsenen, ferner *Labbe-Boulin* (22) bei Fieberkranken.

Nun weiß man aber schon seit langem, daß der Hungerzustand mit Acidose einhergeht. Ende des vorigen Jahrhunderts hat *London* (23) bei Kaninchen eine Abnahme der Blutalkalien im Hungerzustand festgestellt.

Über den Einfluß der Alkalizufuhr auf die alimentäre Glykämie im Hungerzustand.

Von
Gertrud Hirsch.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.)

(Eingegangen am 15. August 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Bereits 1913 fand *Elias* (1), daß, wenn er Kaninchen mit Glucose und Säure per os fütterte, die mit Säure behandelten Tiere nur ganz geringe Glykogenmengen in der Leber zu speichern vermochten im Gegensatz zu den Kontrolltieren, die nur Glucose, aber keine Säure erhalten hatten. Bei Kontrollversuchen mit nur mehreren Säuregaben fand er eine Glykogenmobilisierung, Glykosurie und Hyperglykämie. Die Versuche an Kaninchen mit Säure und Glucose ergaben eine stärkere Glykosurie als die Vorversuche, die mit derselben Dosis Glucose ohne Säuregabe angestellt waren. Aus seinen Versuchen schließt *Elias*, daß das Mehr des ausgeschiedenen Zuckers auf Rechnung des durch Säure mobilisierten Zuckers aus dem Glykogen der Leber zu setzen ist. — Er faßt diese Erscheinungen: die Hyperglykämie, die Glykosurie und die Glykogenmobilisierung infolge der Säurewirkung unter dem Namen: „Säurediabetes“ zusammen.

Glykosurien nach intravenösen oder peroralen Gaben von Mineralsäuren und organischen Säuren haben schon *Naunyn*, *Frerichs*, *Pavy*, *Kueltz* und *Goltz* (2) im letzten Drittel des 19. Jahrhunderts beschrieben. Eine Bestätigung der Annahme, daß die Säuren den Glykogenabbau in der Leber bewirken, fand *Paul Ehrlich* (3), der folgende Versuche machte: Er legte Frösche einmal in saure, einmal in alkalische Zuckerlösung. Dabei stellte er fest, daß es bei den Fröschen unter saurer Lösung zu einem Glykogenabbau, bei denen unter alkalischer Lösung zu einem Glykogenaufbau kam. Ferner sah *Elias* (1) bei Durchspülungsversuchen an isolierten Schildkrötenlebern, daß der mit saurer Ringerlösung durchspülte Leberlappen Glykogen abbaute, der mit alkalischer Lösung durchspülte Glykogen ansetzte.

Elias Befunde bezüglich des Säurediabetes beim Kaninchen wurden von *Underhill* und *Murlin* (4) und *E. Lesser* (5) bestätigt. Beim Hunde fand *Elias* nach peroraler Säurezufuhr einen geringen Anstieg des Blut-

zuckers, während *Torrez* (6) bei Hunden nach intravenöser Säurezufuhr, bei normalen sowohl, als auch bei kohlehydratgemästeten Tieren, keine Blutzuckererhöhung, sondern im Gegenteil im Verlauf von 2 Stunden nach den Injektionen eine starke Hypoglykämie fand. *Bertram* (7) bestätigte diese Versuchsergebnisse, fügt aber hinzu, daß er bei ganz jungen Hunden den gleichen Säurediabetes hervorrufen konnte wie *Elias* bei seinen Kaninchen. Er versucht das verschiedene Verhalten bei Pflanzen- und Fleischfressern so zu erklären, daß einmal die Karnivoren rasch mit Hilfe des NH_3 aus dem Harnstoff der Leber die Säuren zu neutralisieren vermögen, was bei den Herbivoren nicht der Fall ist, und zweitens sich die Einstellung auf die normale Blutreaktion nach der Säurezufuhr auch rascher vollzieht, weil bei ihnen der Flüssigkeitsaustausch zwischen Blut und Gewebe lebhafter und schneller vor sich geht als bei den Pflanzenfressern.

Die Säure-Glucoseversuche von *Elias* konnte *Bertram* (8) voll beim Hunde bestätigen. Er fand die alimentäre Hyperglykämie nach intravenöser Salzsäurezufuhr gegenüber der Norm wesentlich erhöht. Für eine Herabsetzung der alimentären Hyperglykämie nach Alkalizufuhr (NaHCO_3) konnte er aber keine eindeutigen Versuchsergebnisse bringen. Eine Alkaliwirkung auf den Blutzucker des erwachsenen Hundes ist nicht vorhanden. Das zeigt *Sergios Serefis* (9) bei der Adrenalinhyperglykämie, dagegen hemmt Alkalizufuhr die Adrenalinzuckerwirkung beim jungen Hunde.

Weitere Beiträge zum Kapitel Säurediabetes bringen *Fujimaki* (10), *Kochler* (11) und *Bertram* (12).

Eine bedeutsame Rolle bei der Frage der Zuckertoleranz spielt die Diät, sowohl die Art als auch die Menge der Nahrung. Eiweiß-Fett-diät setzt die Zuckertoleranz herab, Kohlehydratdiät erhöht sie [*Bertram* (13)]. *Staub* (14) zeigte bereits 1921 diese Tatsache an Versuchen, die er an Menschen anstellte, und erklärte sie durch „Bahnungsvorgänge“ im Organismus.

Bezüglich der Nahrungsmenge hat schon 1890 *F. Hofmeister* (15) beobachtet, daß hungernde Hunde nach Fütterung von Kohlehydraten Zucker ausscheiden bei KH-Mengen, die normale Hunde ohne weiteres, bewältigen. *Hoppe-Seyler* (16) spricht von einer „Vaganten-Glykosurie“, die dem unfreiwilligen Fasten der Landstreicher zuzuschreiben ist. *Staub* (17) fand nach Traubenzuckergabe von 20 bis 100 g bei einem gut genährten Manne 30 bis 50 % Hyperglykämie, bei einem Manne, der 3 Tage gehungert hatte, 243 % Hyperglykämie. *Du Vigneaud* und *Karr* (18) haben mit Kaninchen gearbeitet und erweitern *Staubs* Befunde. *Bornstein* und *Holm* (19) machten ihre Versuche an Menschen und stellten fest, daß, wenn man nach zwölfstündigem Hungern 100 g Traubenzucker zuführt, der Blutzucker weniger ansteigt, wenn dem Fasten eine Kohlehydratmahlzeit voranging, als wenn man vorher eine Fett-Eiweißdiät gab. Entsprechende Versuchsergebnisse erzielten *Bang* (20) und *Gunnar Boe* (21) an Kaninchen, *Barrenscheen* (21) an überlebenden durchbluteten Kaninchenlebern (schlechtere Glykogensynthese der Hungerleber), *Rietschel* (21) und *Lindberg* (21) an Säuglingen und *Bergmark* (21) an Erwachsenen, ferner *Labbe-Boulin* (22) bei Fieberkranken.

Nun weiß man aber schon seit langem, daß der Hungerzustand mit Acidose einhergeht. Ende des vorigen Jahrhunderts hat *London* (23) bei Kaninchen eine Abnahme der Blutalkalien im Hungerzustand festgestellt.

Hofmeister (15) und *Hoppe-Seyler* (16) sahen ihren Hungerdiabetes mit einer Acidose einhergehen. Andere Forscher, *Wessilkin*, *Polany*, *Rolly* (24), haben im Hungerzustande ein Steigen der Wasserstoffionenkonzentration im Blute festgestellt. *Elias* hat mit Hilfe der Titrimethode bei Hunden gefunden, daß die Alkalinität von 112,8 mg in der Norm auf 52 mg im Hunger herabgesetzt war. *Walinsky* (25) zeigt, daß beim Hungern die Alkalireserve in den ersten 24 Stunden um 6,8%, nach 48 Stunden um 18% gefallen ist, und daß die Rückkehr zur Norm nach eintägiger Kohlehydratkost erfolgt. Er sieht die Reservealkaliwerte im Blute als gültigen Maßstab für den Säuregehalt im Blute an. *Schiff* und *Choremis* (26) weisen nach, daß bei Hunger und Wassermangel ein Anstieg des anorganischen Phosphors und ein stärkeres Sinken der Blutalkalireserve erfolgt. Daß auch die Hungeracidose, ebenso wie der Hungerdiabetes, sehr von der vorausgehenden Diät abhängt, zeigt *Goldblatt* (29), bei derjenigen vorausgehenden Kost, die die besten Glykogendepots schafft, also einer Kohlehydratkost, tritt sie am spätesten auf. Und zwar haben Glucose, Fructose und Saccharose in Mengen von 50 g eine erhebliche antiketogene Kraft, während Galaktose, Mannose, Lactose und anscheinend auch Glycerin unwirksam sind.

Bei der Feststellung all dieser Tatsachen liegt der Schluß, daß der Hungerdiabetes auf einer Säureätiologie beruht, nahe. Bestärkt wird man in dieser Vermutung noch durch die Tatsache, daß durch Splanchnikotomie sich das Zustandekommen des Hungerdiabetes nicht verhindern läßt [*Elias* (1)], also er nicht mit dem Adrenalindiabetes identisch ist. Man weiß, z. B. durch Versuche *Staub's*, daß Hungerdiabetes und Acidose zusammen auftreten, und da ergibt sich unfern die Frage: Ist die alimentäre Hyperglykämie im ausgesprochenen Hungerzustand durch Alkalien einflußbar? *Du Vigneaud* und *Karr* (18) sind dieser Frage nähergetreten. Sie verfolgten bei ihren Versuchen Kaninchen NaHCO_3 entweder gleichzeitig mit dem Zucker, einige Stunden vor der Zuckertoleranzprobe oder eine Nacht vorher, oder sie ließen die Tiere hungern und gaben an jedem Fastentag 1 g NaHCO_3 . Bei dem letzten Versuch war die Zuckertoleranz gegenüber einem normalen Tiere erhöht, bei den anderen Versuchen hatte die Alkalizufuhr wenig Wirkung auf die Zuckertoleranz.

Wir beschäftigten uns eingehender mit dieser Frage und machten unsere Versuche an Menschen, an Hunden und an Kaninchen.

Zunächst nahmen wir Kaninchen als Versuchstiere. Die Versuchsanordnung war folgende: Bei Versuch 1 und 2 bekamen die Tiere drei Tage nichts zu fressen und nichts zu trinken. Am vierten Tage wurde eine Zuckertoleranzprobe angestellt. Die Zuckermenge, die dazu verabfolgt wurde, betrug 1,5 g Traubenzucker pro Kilo Körpergewicht, sie wurde mit Hilfe der Schlundsonde, in Wasser gelöst, gegeben. Die Zuckerausscheidung im Urin wurde nicht berücksichtigt, lediglich der Blutzuckergehalt wurde festgestellt, und zwar nach der *Hagedorn*-Methode (28). Es geschahen zuerst zwei Nüchtern-Blutzuckerbestimmungen, eine $\frac{1}{2}$ Stunde vor der Zuckergabe, die zweite unmittelbar vorher, daraus wurde der Mittelwert berechnet. Die folgenden *Hagedorn*-Bestimmungen wurden $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, $1\frac{1}{2}$, 2, 3, und 4 Stunden nach der Zuckergabe gemacht. Nach diesen ersten Versuchen wurden

die Tiere drei Wochen normal ernährt, sie erreichten ungefähr ihr Anfangsgewicht wieder. Dann wurden sie abermals drei Tage vollständig nüchtern gehalten. Am vierten Tage bekamen sie nach zwei Nüchternblutzuckerbestimmungen 0,5 g NaHCO_3 pro Kilo Körpergewicht, 25 Minuten danach wurde der nächste Blutzucker bestimmt, dann wurde 30 Minuten nach der NaHCO_3 -Gabe der Traubenzucker wieder 1,5 g pro Kilo Körpergewicht, dargereicht. Die nächsten Blutentnahmen erfolgten in der gleichen Zeitfolge wie bei den ersten Versuchen. Die Zucker- und NaHCO_3 -Mengen wurden auf Grund des Gewichtes nach dem Fasten berechnet.

Die weiteren vier Versuche hatten die gleiche Anordnung, nur fasteten die Tiere nicht 3, sondern 4 Tage.

Als nächstes Versuchstier nahmen wir einen Hund, den wir 4 Tage hungern ließen. Am fünften Tage erhielt er, nachdem zwei Nüchternblutzuckerwerte bestimmt worden waren, 2,0 g Traubenzucker pro Kilo seines Körpergewichtes, alsdann wurden die Blutzuckerbestimmungen in derselben Aufeinanderfolge gemacht wie bei den Kaninchenversuchen. Nach 14 Tagen wurde der Parallelversuch mit Alkalizufuhr angestellt. Die Versuchsanordnung war wieder die gleiche, nur wurde zwischen die Nüchternblutentnahme und die Zuckergabe eine NaHCO_3 -Gabe von 1 g pro Kilo Körpergewicht mit 25 Minuten später erfolgender Blutzuckerbestimmung eingeschoben.

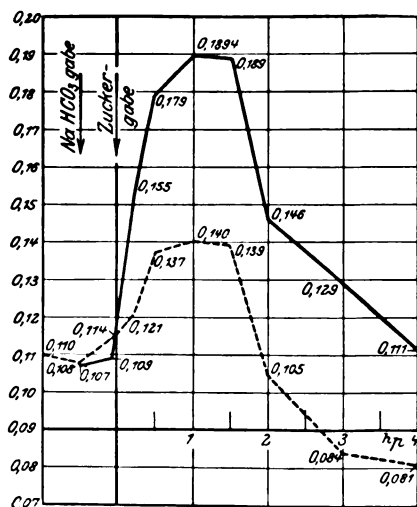


Abb. 1. Mittelwertskurve.

Um festzustellen, ob bei diesen Versuchen die Verabfolgung von Alkali einen Einfluß auf den Ablauf der alimentären Hyperglykämie hat, verglichen wir die Blutzuckerwerte der Versuche a und b, und zwar bezüglich 1. der Höhe des Blutzuckeranstiegs, 2. der Zeit des Anstiegs, 3. der Dauer der Hyperglykämie, 4. der Art des Abfalles und 5. der Tiefe des Abfalles.

Bezüglich der Höhe des Blutzuckeranstiegs findet man, daß bei sämtlichen Versuchen die Kurve der Versuche mit Alkalizufuhr im ganzen bedeutend niedriger ist, als die ohne NaHCO_3 -Gabe. Bringt man die Mittelwertskurven von den beiden Parallelversuchen in ein Koordinatensystem (Kurve Abb. 1), so liegt die Kurve b absolut unter der

unter dem Höchstwert der ersten Kurvenhälfte liegt; 4 Stunden nach der zweiten Zuckergabe hat der Blutzuckerwert wieder abgenommen und ist jetzt unter den Anfangswert gesunken. Bestätigungen dieser Resultate findet man bei *Severinghaus* (29) und *Du Vigneaud* und *Karr* (18), die beide gezeigt haben, daß bei aufeinanderfolgenden Zuckergaben bei der zweiten und dritten Gabe keine weitere Steigerung des Blutzuckers erfolgt, sondern eher eine geringe Abnahme. Kurve *b* dieses Versuches ist der Kurve *a* in der ersten Hälfte ähnlich, nur liegen ihre Werte im ganzen niedriger, der Abfall vom Höhepunkt ist tiefer. Die zweite Hälfte verhält sich anders als die der Kurve *a*. Ihr Anstieg nach der zweiten Zuckergabe ist steiler und höher — er beträgt 0,085 mg-%, der der ersten Hälfte dagegen nur 0,070 mg-% — nach 1 Stunde ist ein Punkt erreicht, der nur wenig unter dem Höchstpunkt der ersten Hälfte, etwas über dem Höchstpunkt der Kurve *a* zweite Hälfte liegt. Von da erfolgt in der nächsten Stunde ein steiler Abfall, in der dritten und vierten Stunde nach der zweiten Zuckergabe ein abermaliger Anstieg, der flacher und geringer als der erste ist. Im ganzen decken sich also die ersten Kurvenhälften mit denen der einfachen Glucose- und Glucose-Alkali-Versuche. Was die zweiten Hälften anlangt, so sieht man, daß bei dem Alkali-versuch die erhöhte Zuckertoleranz nach der zweiten Zuckergabe des ersten Versuches wegfällt, der Anstieg der zweiten Hälfte der Kurve *b* ist stärker als der der ersten Hälfte, dafür etwas weniger lange anhaltend.

Unsere letzten Versuche am Menschen hatten folgende Anordnung: Die Versuchsperson hungerte 38 Stunden. Mit den Zuckerbelastungsproben wurden gleichzeitig Respirationsversuche und p_H -Bestimmungen im Urin gemacht. Zunächst geschah eine Nüchternblutzuckerprobe, dann folgten der Traubenzuckergabe (50 g) sieben weitere Bestimmungen, deren genauer Zeitpunkt aus der Tabelle I, die auch die Versuchsergebnisse bringt, ersichtlich ist. Der Zucker-Alkali-versuch geschah in derselben Weise, zwischen die Nüchternentnahme und die Zuckergabe wurde die Alkalizufuhr (2 g Natriumacetat) mit 50 Minuten später erfolgnder Zuckerbestimmung eingeschoben. Dieser Versuch ist auch in Tabelle I niedergelegt. Für die Respirationsversuche wurde die *Zuntz-Geppertsche* Gasuhr benutzt. Die Wasserstoffionenkonzentration im Urin wurde nach der kolorimetrischen Methode von *Michaelis* bestimmt. Die Blutzuckerkurven dieser Versuche zeigten denselben Verlauf wie die der Tierversuche. Es war deutlich die alkalotische Wirkung zu bemerken. Auch die Azidität des Urins wurde durch die Natriumacetatzufuhr herabgesetzt, beim einfachen Zuckerversuch steigt das p_H von 5,15 nach 70 Minuten auf 5,2, nach 100 Minuten auf 6,9, beim Natriumacetat-Zuckerversuch von 5,5 nach 50 Minuten auf 6,0, nach 120 Minuten auf 7,4, nach 180 Minuten auf 7,5. Der Sauerstoff-

Tabelle I.

Zeit	Ventilation pro Minute	Respi- rations- quotient	CO ₂ - Bildung pro Minute	O ₂ - Verbrauch pro Minute	Blutzucker	p _H im Urin
Versuch a)						
8h17'— 8h27,5'	4,600	0,748	169,1	226	0,084 mg	5,15 65 cem
8 28 — 8 38 ¹ / ₄	4,605	0,756	168,1	222,4	50 g Dextrose	
9 20 — 9 27,5	4,966	0,713	186,1	261,2	0,112 p. 20'	
9 32 — 9 40	4,535	0,720	176,0	244,5	0,122 p. 35	
9 44 — 9 53,5	5,116	0,801	193,4	241,6	0,148 p. 50	5,2 184 cem
10 06 — 0 16	4,680	0,753	179,4	238,3	0,169 p. 70	
11 45 — 11 54,5	5,316	0,808	196,4	242,9	0,121 p. 165	
12 04 — 12 14,5	4,952	0,770	180,7	234,7	0,093 p. 190	
1 05 — 1 14	5,196	0,758	181,4	239,3	0,094 p. 250	Spez.-dynamische Wirkung durch 50 g Dextrose: 23,185 Cal
Versuch b)						
8h35'— 8h45'	4,791	0,733	197,1	268,9	0,085	6,00 95 cem
8 44 — 8 57	4,659	0,756	193	255,1	2 g Na-Acetat	
9 30	—	—	—	—	0,081	
9 50	—	—	—	—	50 g Dextrose	
10 07 — 10 15 ¹ / ₂	5,941	0,718	209,6	291,8	0,118 p. 25'	7,4 55 cem
10 22 — 10 28 ¹ / ₂	6,141	0,759	221	291	0,127 p. 38	
10 32 — 10 40 ¹ / ₂	5,965	0,763	209,7	274,9	0,124 p. 50	
10 47 — 10 55	6,125	0,792	214,6	270,9	0,118 p. 65	
11 39 — 11 47 ¹ / ₂	6,094	0,802	216,8	270,2	0,147 p. 120	7,5 88 cem
12 36 — 12 43 ¹ / ₂	6,173	0,854	225,4	263,8	0,153 p. 180	Spez.-dynamische Wirkung durch 50 g Dextrose: 12,2 Cal
1 35 — 1 43	5,363	0,770	196,7	255,5	0,070 p. 240	

verbrauch in der Ruhe ist im ersten Versuch geringer als im zweiten, dadurch ergibt sich im Versuch ohne Natriumacetat eine stärkere spezifisch-dynamische Wirkung im Vergleich zum Versuch b mit Natriumacetatzufuhr. Die geringere spezifisch-dynamische Wirkung ist jedoch an sich die wahrscheinlichere, weil sie mit den übrigen Werten in der Literatur (31) übereinstimmt. Es ist daher keine Sicherheit in der Annahme, daß die Alkalizufuhr die spezifisch-dynamische Wirkung der Dextrose herabsetzt, vorhanden. Zur Klärung dieser Frage wären weitere Versuche erwünscht. Der respiratorische Quotient ist in dem Natriumacetatversuch länger und stärker erhöht als in dem einfachen Zuckerversuch. Es macht den Eindruck, als ob das Natriumacetat die Zuckerverbrennung angeregt hat, doch genügt auch zur Entscheidung dieser Frage der Einzelversuch nicht. Respiratorischer Quotient und Blutzucker steigen bei beiden Versuchen nicht gleichzeitig, sondern zunächst erhöhen sich nur die Blutzuckerwerte, und zwar bereits 20 Minuten nach der Zuckergabe, während die respiratorischen Quotienten

unter dem Höchstwert der ersten Kurvenhälfte liegt; 4 Stunden nach der zweiten Zuckergabe hat der Blutzuckerwert wieder abgenommen und ist jetzt unter den Anfangswert gesunken. Bestätigungen dieser Resultate findet man bei *Sevringhaus* (29) und *Du Vigneaud* und *Karr* (18), die beide gezeigt haben, daß bei aufeinanderfolgenden Zuckergaben bei der zweiten und dritten Gabe keine weitere Steigerung des Blutzuckers erfolgt, sondern eher eine geringe Abnahme. Kurve *b* dieses Versuches ist der Kurve *a* in der ersten Hälfte ähnlich, nur liegen ihre Werte im ganzen niedriger, der Abfall vom Höhepunkt ist tiefer. Die zweite Hälfte verhält sich anders als die der Kurve *a*. Ihr Anstieg nach der zweiten Zuckergabe ist steiler und höher — er beträgt 0,085 mg. %, der der ersten Hälfte dagegen nur 0,070 mg. % — nach 1 Stunde ist ein Punkt erreicht, der nur wenig unter dem Höchstpunkt der ersten Hälfte, etwas über dem Höchstpunkt der Kurve *a* zweite Hälfte liegt. Von da erfolgt in der nächsten Stunde ein steiler Abfall, in der dritten und vierten Stunde nach der zweiten Zuckergabe ein abermaliger Anstieg, der flacher und geringer als der erste ist. Im ganzen decken sich also die ersten Kurvenhälften mit denen der einfachen Glucose- und Glucose-Alkali-Versuche. Was die zweiten Hälften anlangt, so sieht man, daß bei dem Alkaliversuch die erhöhte Zuckertoleranz nach der zweiten Zuckergabe des ersten Versuches wegfällt, der Anstieg der zweiten Hälfte der Kurve *b* ist stärker als der der ersten Hälfte, dafür etwas weniger lange anhaltend.

Unsere letzten Versuche am Menschen hatten folgende Anordnung: Die Versuchsperson hungerte 38 Stunden. Mit den Zuckerbelastungsproben wurden gleichzeitig Respirationsversuche und p_H -Bestimmungen im Urin gemacht. Zunächst geschah eine Nüchternblutzuckerprobe, dann folgten der Traubenzuckergabe (50 g) sieben weitere Bestimmungen, deren genauer Zeitpunkt aus der Tabelle I, die auch die Versuchsergebnisse bringt, ersichtlich ist. Der Zucker-Alkaliversuch geschah in derselben Weise, zwischen die Nüchternentnahme und die Zuckergabe wurde die Alkalizufuhr (2 g Natriumacetat) mit 50 Minuten später erfolgender Zuckerbestimmung eingeschoben. Dieser Versuch ist auch in Tabelle I niedergelegt. Für die Respirationsversuche wurde die *Zuntz-Geppertsche* Gasuhr benutzt. Die Wasserstoffionenkonzentration im Urin wurde nach der kolorimetrischen Methode von *Michaelis* bestimmt. Die Blutzuckerkurven dieser Versuche zeigten denselben Verlauf wie die der Tierversuche. Es war deutlich die alkalotische Wirkung zu bemerken. Auch die Azidität des Urins wurde durch die Natriumacetatzufuhr herabgesetzt, beim einfachen Zuckerversuch steigt das p_H von 5,15 nach 70 Minuten auf 5,2, nach 100 Minuten auf 6,9, beim Natriumacetat-Zuckerversuch von 5,5 nach 50 Minuten auf 6,0, nach 120 Minuten auf 7,4, nach 180 Minuten auf 7,5. Der Sauerstoff-

Autorenverzeichnis.

- Barrenscheen, H. K.* und *Robert Berger*. Zur Analyse der Insulinwirkung. I. Mitteilung: Die Hemmung der Phosphatausscheidung durch Insulin. S. 302.
- Barrenscheen, H. K.*, *A. Eisler* und *L. Popper*. Beiträge zum Problem des Blutzuckers. VIII. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorkurve. 6. Adrenalin. S. 119.
- Barrenscheen, H. K.* und *Luise Messiner*. Eine kolorimetrische Mikrobestimmung des Natriums. S. 308.
- Barthmeyer, Helene* s. *Hans Schmalfuß*.
- Bechhold, H.* und *L. Keiner*. Trennung von Trypsin und Enterokinase durch Ultrafiltration. S. 1.
- Behrens, W. U.* Die Verteilung der Milchsäure zwischen Wasser und Äther sowie Wasser und Amylalkohol. Bemerkung zu der gleichbetitelten Arbeit von *R. Dietzel* und *E. Rosenbaum*. S. 348.
- Berger, Robert* s. *H. K. Barrenscheen*.
- Brandes, Hans* s. *Hans Schmalfuß*.
- Chrometzka, Fr.* s. *P. Rona*.
- Dische, Zacharias*. Über charakteristische Farbreaktionen der Milchsäure, des Methylglyoxals und der Kohlehydrate mit Carbazol und Schwefelsäure. S. 77.
- Doskočil, Ant.* Biochemische Beobachtungen über das Wachstum der Typhusbazillen. S. 314.
- Eisler, A.* s. *H. K. Barrenscheen*.
- Fernau, A.* Über die Wirkung der durchdringenden Radiumstrahlung auf Pseudoglobulin. S. 172.
- Forrai, Elemér*. Insulin und Fructose-diphosphorsäure. S. 150.
- Untersuchungen über menschliche Fructosediphosphatase. II. S. 155.
- Forrai, E.* und *R. Sivó*. Physikalisch-chemische Eigenschaften des Bilirubins in Körperflüssigkeiten. S. 162.
- Forrai, E.* s. *R. Sivó*.
- Gehrke, M.* s. *W. Schoeller*.
- Goldhammer, Helene*. Über die Oxydation von Phenol mit Wasserstoffsuperoxyd unter Zusatz von Eisensalzen. S. 81.
- Gondo, Kumataro* s. *Kinsaburo Hirai*.
- Heiduschka, A.* und *H. Tettenborn*. Über Galaktoaraban der Lupinensamen. (Vorläufige Mitteilung.) S. 203.
- Hepner, Josef* und *Oktavian Wagner*. Insulin und Fettstoffwechsel. Ein Beitrag zur Theorie der Insulinwirkung. S. 322.
- Hirai, Kinsaburo*. Über die Synthese des d, l-2, 5-Dioxyphenylalanins. S. 88.
- Hirai, Kinsaburo* und *Kumataro Gondo*. Über Dopa-Hyperglykämie. S. 92.
- Hirsch, Gertrud*. Über den Einfluß der Alkalizufuhr auf die alimentäre Glykämie im Hungerzustand. S. 451.
- Jendrassik, A.* und *A. G. Keményfi*. Zur Kenntnis des D-Vitasterins. I. Mitteilung: Über die Aktivierbarkeit des Cholesterins. S. 180.

beider Versuche erst nach ungefähr einer Stunde zu steigen beginnen, eine Wahrnehmung, die auch *Bornstein* und *Holm* (19) und *Goldblatt* (30) gemacht haben.

Zusammenfassend kann man also sagen, daß die Frage, ob Alkalizufuhr die alimentäre Hyperglykämie in ausgesprochenem Hungerzustand beeinflußt, zu bejahen ist, und zwar in dem Sinne: 1. daß die Blutzuckerkurve durch das Alkali im Vergleich zum einfachen Glucoseversuch im ganzen niedriger gehalten wird; 2. daß es 4 Stunden nach der Zuckergabe zu einer Hypoglykämie kommt, was bei dem einfachen Glucoseversuch nicht der Fall ist oder nur angedeutet ist; 3. daß bei mehrfachen Zuckergaben beim Alkaliversuch die erhöhte Zuckertoleranz, die in den Kurven nach der zweiten Zuckergabe beim einfachen Zuckerversuch zum Ausdruck kommt, beim Zucker-Alkaliversuch fortfällt; 4. daß die spezifisch-dynamische Wirkung im Sinne einer Herabsetzung; 5. daß der respiratorische Quotient im Sinne einer Erhöhung beeinflußt wird, daß aber die beiden letzten Ergebnisse noch einer Bestätigung durch weitere Versuche bedürfen.

Literatur.

- 1) *Elias*, diese Zeitschr. **118**, 93, 1921. — 2) *Naunyn, Frerichs, Pavy, Kueltz, Goltz*, zitiert nach *Elias*. — 3) *Ehrlich*, Arch. f. d. ges. Physiol. **121**, 236. — 4) *Underhill und Murlin*, zitiert nach *Elias*. — 5) *Lesser*, zitiert nach *Elias*. — 6) *Torrez*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **87**, 123, 1923. — 7) *Bertram*, ebendasselbst **43**, 407, 1924. — 8) *Derselbe*, ebendasselbst **43**, 421, 1924. — 9) *Sergios Serefis*, ebendasselbst **43**, 438, 1924. — 10) *Fujimaki*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **102**, 236, 1924. — 11) *Koehler*, Journ. of biol. Chem. **67**, Nr. 2, S. 45, 1926. — 12) *Bertram*, Vortrag im biologischen Verein Hamburg, Winter 1926. — 13) *Derselbe*, Klin. Wochenschr. 1926, 5. Jahrg., Nr. 46, S. 2. — 14) *Staub*, diese Zeitschr. **118**, 93, 1921. — 15) *Hofmeister*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **26**, 1890. — 16) *Hoppe-Seyler*, zitiert nach *Elias*. — 17) *Traugott*, Klin. Wochenschr. **1**, 892, 1922. — 18) *Du Vigneaud und Karr*, Journ. of biol. Chem. **66**, S. 1, 1925. — 19) *Bornstein-Holm*, diese Zeitschr. **130**, 1922. — 20) *Bang*, „Der Blutzucker“, 1. Aufl., 1913. — 21) *Gunnar Boe, Barrenscheen, Rietschel und Lindberg, Bergmark*, zitiert nach *Elias*. — 22) *Labbe-Boulin*, Bull. de la société mé. des Hôpitaux de Paris **49**, 1358, 1925. — 23) *London*, zitiert nach *Elias*. — 24) *Wesselkin, Polany, Rolly*, zitiert nach *Elias*. — 25) *Walinski*, Klin. Wochenschr. 1926, Nr. 24. — 26) *Schiff-Choremis*, ebendasselbst 1926, S. 1826. — 27) *Goldblatt*, Biochem. Journ. **19**, 948, 1925. — 28) *Hagedorn*, diese Zeitschr. **135**, 46, 1923. — 29) *Sevringhaus*, Journ. of biol. Chem. **67**, Nr. 2, 1926. — 30) *Goldblatt*, Biochem. Journ. **15**, Nr. 6, 1925. — 31) *Schirlütz*, diese Zeitschr. **183**, H. 1/3, 23, 1927.

Autorenverzeichnis.

- Barrenscheen, H. K.* und *Robert Berger*. Zur Analyse der Insulinwirkung. I. Mitteilung: Die Hemmung der Phosphatasscheidung durch Insulin. S. 302.
- Barrenscheen, H. K., A. Eisler* und *L. Popper*. Beiträge zum Problem des Blutzuckers. VIII. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorkurve. 6. Adrenalin. S. 119.
- Barrenscheen, H. K.* und *Luise Messiner*. Eine kolorimetrische Mikrobestimmung des Natriums. S. 308.
- Barthmeyer, Helene* s. *Hans Schmalfuß*.
- Bechhold, H.* und *L. Keiner*. Trennung von Trypsin und Enterokinase durch Ultrafiltration. S. 1.
- Behrens, W. U.* Die Verteilung der Milchsäure zwischen Wasser und Äther sowie Wasser und Amylalkohol. Bemerkung zu der gleichbetitelten Arbeit von *R. Dietzel* und *E. Rosenbaum*. S. 348.
- Berger, Robert* s. *H. K. Barrenscheen*.
- Brandes, Hans* s. *Hans Schmalfuß*.
- Chrometzka, Fr.* s. *P. Rona*.
- Dische, Zacharias*. Über charakteristische Farbreaktionen der Milchsäure, des Methylglyoxals und der Kohlehydrate mit Carbazol und Schwefelsäure. S. 77.
- Doskočil, Ant.* Biochemische Beobachtungen über das Wachstum der Typhusbazillen. S. 314.
- Eisler, A.* s. *H. K. Barrenscheen*.
- Fernau, A.* Über die Wirkung der durchdringenden Radiumstrahlung auf Pseudoglobulin. S. 172.
- Forrai, Elemér*. Insulin und Fructose-diphosphorsäure. S. 150.
- Untersuchungen über menschliche Fructosediphosphatase. II. S. 155.
- Forrai, E.* und *R. Sivó*. Physikalisch-chemische Eigenschaften des Bilirubins in Körperflüssigkeiten. S. 162.
- Forrai, E.* s. *R. Sivó*.
- Gehrke, M.* s. *W. Schoeller*.
- Goldhammer, Helene*. Über die Oxydation von Phenol mit Wasserstoffsuperoxyd unter Zusatz von Eisensalzen. S. 81.
- Gondo, Kumataro* s. *Kinsaburo Hirai*.
- Heiduschka, A.* und *H. Tettenborn*. Über Galaktoaraban der Lupinensamen. (Vorläufige Mitteilung.) S. 203.
- Hepner, Josef* und *Oktavian Wagner*. Insulin und Fettstoffwechsel. Ein Beitrag zur Theorie der Insulinwirkung. S. 322.
- Hirai, Kinsaburo*. Über die Synthese des d, l-2, 5-Dioxyphenylalanins. S. 88.
- Hirai, Kinsaburo* und *Kumataro Gondo*. Über Dopa-Hyperglykämie. S. 92.
- Hirsch, Gertrud*. Über den Einfluß der Alkalizufuhr auf die alimentäre Glykämie im Hungerzustand. S. 451.
- Jendrassik, A.* und *A. G. Keményfi*. Zur Kenntnis des D-Vitasterins. I. Mitteilung: Über die Aktivierbarkeit des Cholesterins. S. 180.

- Jurišić, P. J.* Untersuchungen über die Bedeutung der ζ -Potentiale für elektroosmotische Flüssigkeitsüberführung durch Kolloidummembranen. Ein Versuch zu einer neuen Theorie der anomalen Osmose. S. 294.
- Keiner, L.* s. *H. Bechhold.*
- Keményffi, A. G.* s. *A. Jendrassik.*
- Kolthoff, J. M.* Über die Anwendung von Mischindikatoren in der Acidimetrie und Alkalimetrie. S. 26.
- Kolthoff, J. M.* und *J. J. Vleeschhouwer.* Eine Vervollständigung der Reihe Pufferlösungen im alkalischen Gebiet. S. 191.
- Krebs, Hans Adolf.* Über den Stoffwechsel der Netzhaut. S. 57.
- Krebs, Hans Adolf* und *Fritz Kubowitz.* Über den Stoffwechsel von Carcinomzellen in Carcinomserum und Normalserum. S. 194.
- Kubowitz, Fritz* s. *Hans Adolf Krebs.*
- Kubowitz, Fritz* s. *Otto Warburg.*
- Kuen, Franz Meinrad.* Über die quantitative Bestimmung des Carnosins. S. 60.
- Maurer, Kurt.* Über die biochemische Überführung von Oximino-brenztraubensäure in Alanin. S. 216.
- Messiner, Luise* s. *H. K. Barrenscheen.*
- Michael, S.* s. *W. Schoeller.*
- Němec, Antonín.* Kolorimetrische Kalibestimmung in wässrigen Bodenauszügen als Indikator der Düngungsbedürftigkeit. S. 50.
- Nicolai, H. W.* s. *P. Rona.*
- Notkina, L.* s. *W. Zaleski.*
- Oparin, A.* und *N. Pospelowa.* Der Fermentgehalt ruhender Weizen-samen. S. 18.
- Ozaki, Junichi.* Über den relativen Nährwert der Fette. II. S. 233.
- Pissarjewsky, Olga* s. *W. Zaleski.*
- Popper, L.* s. *H. K. Barrenscheen.*
- Pospelowa, N.* s. *A. Oparin.*
- Remesow, Igor.* Ein neues Vakuum-Widerstandsgefäß für Leitfähigkeitsbestimmung und konduktometrische Maßanalyse. S. 33.
- Rona, P.* und *Fr. Chrometzka.* Beiträge zur Frage der fermentativen Eiweißsynthese. S. 249.
- Rona, P.* und *H. W. Nicolai.* Untersuchungen über die Giftwirkung der Chininkörper auf das Gärvermögen lebender Hefe. S. 331.
- Sahashi, Yoshikazu.* Synthese der durch Hydrolyse des Roh-Oryzanins entstehenden β -Säure (2, 6 - Dioxychinolin - 4 - carbon-säure). S. 208.
- Scharrer, K.* Zur Kenntnis der Hydroperoxyd spaltenden Eigenschaft der Böden. S. 125.
- Schmalfuß, Hans, Helene Barthmeyer* und *Hans Brandes.* Warum schwärzen sich die Hülsen von *Sarothamnus scoparius* Wimm., dem Besenginster? S. 229.
- Schmalfuß, Hans, Karl Spitzer* und *Hans Brandes.* Kolorimetrische Bestimmung von o-Dioxybenzolen. S. 226.
- Schmalfuß, Hans* und *Albert Treu.* Über Methyl-n-nonyl-ke-ton aus dem ätherischen Öl der Sojabohne (*Glycine soja* Sieb.). S. 49.
- Schoeller, W., M. Gehrke* und *S. Michael.* Über eine Apparatur zur Messung und Beeinflussung des Gasstoffwechsels von Lebewesen und einige damit erhaltene Ergebnisse. S. 220.
- Simon, Alexander.* Beitrag zur Frage über das Eingreifen des Thyroxins in den intermediären Zellstoffwechsel. S. 265.
- Sivó, Rudolf.* Der normale Bilirubin-spiegel in menschlichen Seren. S. 159.
- Sivó, R.* und *E. Forrai.* Über die Zersetzlichkeit von Bilirubinlösungen, zugleich ein Beitrag zum Bilirubin-nachweis im Urin. S. 168.
- Sivó, R.* s. *E. Forrai.*
- Spitzer, Karl* s. *Hans Schmalfuß.*

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL SCHOOL LIBRARY

**THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW**

Books not returned on time are subject to a fine of 50c per volume after the third day overdue, increasing to \$1.00 per volume after the sixth day. Books not in demand may be renewed if application is made before expiration of loan period.

~~7 DAY~~

~~JAN 10 1958~~

~~12 DAY~~

JUL 14 1976

RETURNED
JUL 9 1976

3m-8,'38(3929s)

STACKS

v.188-189 Biochemische zeitschrift.
1927 46246

SCHOOL LIBRARY

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL SCHOOL LIBRARY

**THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW**

Books not returned on time are subject to a fine of 50c per volume after the third day overdue, increasing to \$1.00 per volume after the sixth day. Books not in demand may be renewed if application is made before expiration of loan period.

~~7 DAY~~

~~JAN 10 1958~~

~~7 DAY~~

~~JUL 10 1976~~

RETURNED

JUL 8 1976

3m-8,'38(3929s)

[illegible]

Digitized by Google

